

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS**  
**Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I**



**TESIS DOCTORAL**

**Búsqueda de nuevos factores pronósticos y de terapias  
combinadas en el tratamiento de neoplasias  
mieloproliferativas**

**MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR**

**PRESENTADA POR**

**Alicia Arenas Cortés**

**Director**

**Joaquín Martínez López**

**Madrid, 2018**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I



TESIS DOCTORAL

**BÚSQUEDA DE NUEVOS FACTORES PRONÓSTICOS Y  
DE TERAPIAS COMBINADAS EN EL TRATAMIENTO  
DE NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS**

Memoria para optar al grado de doctor  
presentada por

Alicia Arenas Cortés

Director:

Dr. Joaquín Martínez López

Madrid, 2017











El Dr. Joaquín Martínez López, profesor asociado de la Facultad de Medicina en la Universidad Complutense de Madrid, Investigador principal de la Unidad de Investigación Clínica de Enfermedades Hematológicas H12O-CNIO en el Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO) y jefe del servicio de Hematología del Hospital Universitario 12 de octubre de Madrid,

#### CERTIFICA

Que le trabajo titulado **“búsqueda de nuevos factores pronósticos y de terapias combinadas en el tratamiento de neoplasias mieloproliferativas”**, que presenta Alicia Arenas Cortés para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Hospital Universitario 12 de Octubre y reúne la calidad contenidos suficientes para ser defendido ante el tribunal correspondiente.

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid a 17 de Abril de 2017.

Fdo. Joaquín Martínez López.







A toda mi familia

A los que están, a los que ya se fueron y  
a los que quedan por venir



## AGRADECIMIENTOS

Este ha sido uno de los viajes más duros que he hecho en toda mi vida. Se me saltan las lágrimas pensando todo el esfuerzo que he invertido en este trabajo, esfuerzo físico, mental y emocional. Y todo esfuerzo tiene su recompensa.

Afortunadamente el camino no lo he tenido que realizar sola. A lo largo del proceso he tenido gente que me han apoyado, animado y levantado cuando, alguna que otra vez, notaba que me fallaban las fuerzas.

Todo empezó en un garaje, donde conocí a las personas que más me ayudaron cuando empecé, Santi y Miguel. Teníamos una reunión en Vivía antes de mi primer día. Por aquellas vueltas que da la vida, Miguel, también has estado ahí, o aquí, según se mire, al final de la tesis. No sabes lo agradecida que te estoy. Muchísimas gracias por las conversaciones y consejos.

Santi, contigo todo era divertido. Recuerdo haber jugado al *curling* con hielo seco o habernos disfrazado de cirujanos locos para trabajar en la campana. Por suerte la época de las batas locas pasó. Esa regresión a la infancia que teníamos de vez en cuando era pura terapia de grupo. ¡Ah! Las conversaciones frikis con Dani tampoco tenían precio.

Pero mi primera compañera, sin duda, fue Alejandra. No me puedo creer que ya hayan pasado cinco años cuando entré en el despacho de Joaquín y te conocí, Ale, ¡nuestro primer día! ¿Y quién nos iba a decir que terminaríamos leyéndonos el pensamiento y cantando juntas los hits del verano, o que íbamos a manejar transpalés por todo el hospital y haber tenido bridas en los cajones por si acaso los necesitábamos otra vez? Ha sido un placer tenerte a mi lado y espero que nuestra amistad dure años y años.

El apoyo de las chicas del despacho también ha sido muy importante. Silvia, Ana, Alba, Ana Isabel y otra vez Alejandra. Desde el día de la crisis de salud ha sido un no parar en muchos sentidos. Gracias por apoyarme tanto en lo personal (he necesitado mucha ayuda ahí, otra vez, gracias), como en lo profesional. ¡Se me olvidaba Richard! Fue breve, pero también fuiste compañero de despacho.

Gracias Inma, sin ti esta tesis no habría podido realizarse, y no sólo la parte de secuenciación. El análisis del exoma fue brutal. Y las búsquedas de CALR terminaron siendo hasta divertidas. Muchas gracias por tu ayuda, tus consejos y ánimos.



Rosa, ¡menuda lata te he dado! Gracias por tu ayuda que ha ido más allá de lo profesional. Juanma, mi hematólogo de cabecera. Gracias por enseñarme a descifrar hemogramas.

También quiero agradecer a las chicas de asistencial. No voy a decir ningún nombre, porque seguro que se me olvida alguno, y no me lo perdonaría. Bueno, sí, sólo a Romi, porque con ella me di cuenta lo llorona que soy pero también lo segura que me hacía sentir el saber que estaba allí. Eres uno de mis ejemplos a seguir.

Esther, que decir de ti... ¡que me he quedado con las ganas de bailar salsa! Jajaja. Aunque admito otros tipos de baile. Me ha encantado tenerte de vecina y de no vecina. Tenemos que salir más por ahí, ¿vale?

Y ahora las tres Marías: María, Mari Luz y... vale, sólo Ale. María, me ha encantado trabajar contigo. He aprendido muchas cosas de ti, unas las he podido aplicar y otras me las guardo para el futuro. Mari Luz, ¡eres una cachonda! No cambies nada, de verdad. Ale, lo que más me acuerdo cuando pienso en ti, es lo de los edificios de células, todavía me parto cuando lo recuerdo. Isa, cuando te hagas la cuenta de instagram de comida sana te seguiré hasta el infinito y más allá.

Lucía, siempre serás mi compañera de estadística. ¡Menuda paliza nos dimos ese año! Bueno, tu más que yo. Te aprecio muchísimo.

En cultivos, además de células, también hemos cultivado amistades (qué cursi, por favor). Menudas tardes nos hemos tirado Laura y yo y más tarde Ana (más Anas, sí), con un sin fin de flasks por pasar, o experimentos interminables.

Y qué puede unir a un cordobés (de Espejo) y una madrileña (de Ávila), pues los cultivos celulares y por supuesto, el inglés. Rafa, tenemos que retomar las clases.

Muchísimas gracias a enfermeras, adjuntos y residentes del servicio, a todos ellos, que me han aguantado y ayudado en todo lo que han podido. Pero sobre todo a Carmen, por todo lo que haces por nosotros. Un muchísimas gracias se queda corto.

Y, por fin, gracias, Joaquín. Gracias por darme esta oportunidad y hacer posible mi sueño.





# ÍNDICE



# ÍNDICE

ÍNDICE .....	17
ABREVIATURAS .....	21
SUMMARY .....	29
RESUMEN .....	31
INTRODUCCIÓN .....	35
1.- Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas BCR/ABL negativas: Mielofibrosis. ....	35
1.1.- Definición y diagnóstico.....	35
1.2.- Factores pronósticos de la MF .....	37
1.3.- Cariotipo .....	38
1.4.- Mapa mutacional de la MF .....	39
1.5.- Eventos fibróticos en la médula ósea.....	51
1.6.- Patogénesis.....	52
2.- Tratamiento farmacológico de las NMPc y de la MF .....	54
2.1.- Tratamientos farmacológicos clásicos.....	54
2.2.- Inhibidores de las proteínas JAK .....	57
2.3.- Combinaciones de fármacos.....	59
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	65
1.- FUNDAMENTOS .....	65
2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	66
3.- OBJETIVOS .....	66
PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS .....	71
1.- Material biológico: pacientes y líneas celulares. ....	71
1.1.- Pacientes:.....	71
1.2.- Líneas celulares: .....	72
2.- Secuenciación de Nueva Generación (NGS) de un panel de genes relacionados con patología mieloide. ....	73
2.1.-Preparación de las librerías .....	74
2.2.- Secuenciación.....	78
2.3.- Análisis de las variantes encontradas.....	79
2.4.- Recogida de datos clínicos.....	79
2.5.- Análisis estadístico: .....	81
3.- Estudio de la sensibilidad del ruxolitinib ex vivo .....	81

3.1.- Método directo .....	82
3.2.- Modelo clásico .....	82
3.3.- Modelo de amplificación celular .....	83
3.4.- Recogida de datos clínicos. ....	84
3.5.- Análisis bioinformático y estadístico de los resultados. ....	84
4.- Búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib: cribado de fármacos .....	85
4.1.- Procesamiento de la muestra y análisis por citometría de flujo.....	86
4.2.- Análisis de datos de curvas de inhibición y sinergias. ....	88
5.- Estudio del efecto de la combinación de fármacos elegida en la fase previa sobre la célula patológica .....	90
5.1.-Curvas dosis-respuesta en líneas celulares: .....	90
5.2.- Curvas dosis-respuesta en pacientes: .....	91
5.3.- Análisis de datos de curvas de inhibición y sinergias. ....	94
5.4.- Estudio de las vías de señalización afectadas por el tratamiento: arrays de proteínas .....	95
6.- Estudio de la capacidad de inhibición del tratamiento elegido de la síntesis de colágeno en células estromales de la médula ósea: .....	102
6.1.- qPCR: .....	102
6.2.- Inmunocitoquímica .....	106
7.- Estudio de resistencias adquiridas al tratamiento:.....	108
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>113</b>
1.- Caracterización de los pacientes con MF mediante NGS. ....	113
1.1.- Información metodológica.....	113
1.2.- Comparación de la secuenciación de muestras de sangre periférica con muestras de médula ósea.....	114
1.3.- Descripción de las mutaciones.....	115
1.4.- Correlación con la clínica: Estudio de factores diagnósticos y pronósticos en función de: .....	117
1.5.- Respuesta clínica a ruxolitinib.....	122
2.- Estudio de la sensibilidad ex vivo de muestras de pacientes de MF a ruxolitinib .....	123
2.1.- Descripción de los resultados obtenidos con los diferentes modelos ex vivo.....	123
3.- Búsqueda de la mejor terapia combinada con Ruxolitinib.....	128
3.1.- Actividad de los fármacos en solitario.....	129
3.2.- Actividad de la combinación de los fármacos con ruxolitinib.....	133
4.- Estudio de la combinación ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.....	135

4.1.- Estudio en pacientes .....	136
4.2.- Estudio en líneas celulares.....	138
4.3.- Estudio del efecto de la combinación de nilotinib y ruxolitinib en la expresión de colágeno en fibroblastos de médula ósea. ....	149
4.4.- Estudio de resistencias a nilotinib, ruxolitinib y su combinación.....	151
DISCUSIÓN.....	155
1.- Caracterización de los pacientes con MF mediante NGS .....	155
2.- Estudio de la sensibilidad ex vivo de muestras de pacientes de MF a ruxolitinib .....	158
3.- Búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib .....	159
4.- Estudio de la combinación ruxolutinib/nilotinib/prednisolona.....	165
CONCLUSIONES.....	171
BIBLIOGRAFÍA .....	175
ANEXO I: VARIANTES ENCONTRADAS POR NGS .....	185
ANEXO II: ENSAYO CLÍNICO RuNiC .....	187





## ABREVIATURAS

2-HG: 2-hidroxiglutarato

ABB: del inglés, *Annexin Binding Buffer*

ABC: área bajo la curva

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADNc: ADN complementario

AKT: *v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2*

APC: del inglés, *allophycocyanin*

ARN: ácido ribonucleico mensajero

ASXL1: del inglés, *Addition of Sex Combs Like 1*

ATRX: del inglés, *alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*

BC: *barcode*

BCA: ácido bicinconínico

bFGF: del inglés, *basic fibroblast growth factor*, factor de crecimiento fibroblástico básico

BSA: del inglés, *bovine serum albumin*, albúmina de suero bobino

CBL: del inglés, *Casitas B-cell lymphoma*

CD: cluster de diferenciación

Células NK: del inglés, *natural killer*

CFM: citometría de flujo multiparamétrica

CI: del inglés, *combination index*

CP: del inglés, *crossing point*

DAB: diaminobencidina

DAXX: del inglés, *death-domain associated protein*

DIPSS: del inglés, *Dynamic International Prognostic Scoring System*

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO: dimetilsulfóxido

DNMT3A: ADN metiltransferasa

dNTP: desoxiribonucleotidos trifosfato

DRI: del inglés, *dose reduction index*

ECM: del inglés, *extracellular matrix*, matriz extracelular

EDTA: del inglés, *ethylenediaminetetraacetic acid*, ácido etilendiaminotetraacético

EGFR: del inglés, *epidermal growth factor receptor*

EPO: eritropoyetina

ESC: del inglés *endotelial stem cells*

ESE: del inglés, *exonic splicing enhancer*

FBS: del inglés, *fetal bovine serum*

FITC: del inglés, fluorescein isothiocyanate

FOXO: del inglés, *forkhead box O*

GAPDH: el inglés, *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

GM-CSF: del inglés, *granulocyte macrophage- colony stimulating factor*

Hb: Hemoglobina

HRP: del inglés, *horseradish-peroxidase*, peroxidasa de rábano picante

HSC: del inglés hematopoietic stem cell

ICQ: inmunocitoquímica

IDH1/2: isocitrato deshidrogenasa 1 y 2

IL: Interleucina

IMDM: *Iscove's Modified Dulbecco's Medium*

INF- $\alpha$ : interferón- $\alpha$

IPSS: del inglés, *International Prognostic Scoring System*

IQR: rango intercuartílico

JAK: del inglés, *Janus Kinase*

JH: dominio de homología de la familia Janus quinasa

Kb: kilobases

LDH: lactato deshidrogenasa

LMA: leucemia mieloide aguda

LMC: leucemia mieloide crónica

MAF: del inglés, *minor allele frequency*

MAPK: del inglés, *mitogen-activated protein kinase*

MC: mejoría clínica

MF: mielofibrosis

MF: mielofibrosis primaria

MO: médula ósea

MPL: del inglés, *myeloproliferative leukemia*

mTOR: *mammalian target of rapamycin*

NGS: del inglés, *next-generation sequencing*, secuenciación de nueva generación

NMPc: neoplasias mieloproliferativas crónicas

Pb: pares de bases

PBS: del inglés, *phosphate buffer saline*

PCR: del inglés *polymerase chain reaction*

PDGF: del inglés, *platelet-derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas

PE: del inglés, *phycoerythrin*

PerCP, del inglés, *peridinin chlorophyll protein complex*

PFA: paraformaldehído

PI3K: *phosphoinositide 3-kinase*

PIAS: del inglés, *protein inhibitors of activated STATs*

preMF: MF en fase prefibrótica

PTP: del inglés, *protein tyrosine phosphatases*

PV: policitemia vera

PV-MF: post-PV MF

Q-PCR: del inglés, *quantitative PCR*, PCR cuantitativa

RC: Respuesta completa

RNR: ribonucleosido reductasa

ROS: del inglés, *reactive oxygen species*, especies reactivas de oxígeno

RP: respuesta parcial

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

RT-PCR: en inglés, *reverse transcription polymerase chain reaction*, reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa

SCF: del inglés, *Stem Cell Factor*

SCID: del inglés, *severe combined immunodeficiency disease*

SDS: del inglés, *sodium dodecyl sulfate*, dodecil sulfato sódico

SH2: del inglés, *Src homology 2*

SOCS: del inglés, *suppressor of cytokine signaling*

SP: sangre periférica

STAT: del inglés, *signal transducers and activators of transcription*

TAD: del inglés, *C-terminal transactivation domain*

TBS: del inglés *tris buffer saline*, tampón tris salino

TE: trombocitemia esencial

TE-MF: post-TE MF

TET2: del inglés, *ten-eleven translocation*

TGF- $\beta$ : del inglés, *transforming growth factor-beta*, factor de crecimiento transformante beta

TPO: trombopoyetina

TPOR: del inglés, *trombopoyetina receptor*, receptor de la trombopoyetina

TRAIL: del inglés, *tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand*

TYK2: del inglés, *tyrosin Kinasa 2*

VEGF: del inglés, *vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelial vascular

XIAP: del inglés, *X-linked inhibitor of apoptosis*

$\alpha$ -KG:  $\alpha$ -ketoglutarat



# RESÚMENES





## SUMMARY

### Introduction

Myelofibrosis (MF) is a Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasm (NMPc). It is a clonal disorders characterized by increased production of mature blood cells and bone marrow fibrosis. There are three types of MF: primary MF (PMF), post-polycythemia vera MF (PV-MF) and post-essential thrombocythemia MF (ET-MF). The most frequent mutation is JAK2V617F. It can be found around 50-60% of MF. The CALR mutations are in approximately 35-50% of patients. The variety of clinical manifestations and response to treatment cannot be solely explained by these mutations. Thus, it is necessary looking for new mutations in MF patients.

The only therapy approved to treat MF is ruxolitinib, a JAK1/2 inhibitor. It has showed to be an effective therapy. However, the screening of new approaches, like combination therapy with ruxolitinib, is an interesting way to increase its efficacy and decrease the toxicity of ruxolitinib.

### Objectives

- 1.- Study of mutational profile of MF patients by NGS.
- 2.- Develop an *ex vivo* model to study sensitivity to ruxolitinib and synergy of the combinations of drugs.
- 3.- Screening of drugs to find the best combination therapy with ruxolitinib for NMPc.
- 4.- Study the synergistic behavior and the effect on signaling pathways and collagen I expression by ruxolitinib/nilotinib/prednisolone combination.

### Methodology

It has been studied 27 patients with NGS panel of genes related to myeloid diseases. They have been establishes three *ex vivo* models to study ruxolitinib sensitivity and synergistic combination of drugs in MF, and the best model were determined by correlation of *ex vivo* data with clinical data of patients treated with ruxolitinib. In the direct model, peripheral blood (PB) was treated directly with drugs; in classic model, mononuclear cells from PB were treated and seeded simultaneously in methylcellulose and in the amplification model, the mononuclear cells firstly, were seeded in

methycellulose and secondly, treated with ruxolitinib. In the three cases, flow cytometry was used to monitoring viable cells.

The screening of best combination therapy with ruxolitinib has been carried out with amplification model and automated flow cytometry. The selected combination has been studied with viability test wst-8 and bioinformatics analysis of combination index; the signaling pathways affected have been studied with phosphor-protein array and validated by western blot. The effect of the drug combination on collagen I expression has been carried out using qPCR and immunocytochemistry.

### Results

The most frequent mutation in MF was JAK2V617F (66.7%) followed by TET2 (37.0%), ASXL1 (33.3 %), PRPF40B (22.2%), EZH2 (18.5 %) y CALR (18.5 %). A higher mutational burden of JAK2V617F was associated with post PV-MF. A higher mutational burden of mutated CALR was associated with post ET-MF. One or more mutations in TET2, ASXL1, EZH2 e IDH1/2 (genes related to epigenetic regulation) were strongly associated with PMF diagnosis and shorter responses to ruxolitinib than group of patients without mutations in these genes.

The best model of three to study the ruxolitinib sensitivity was the direct model because difference better patients who had long response to treatment. Amplification model was the best to use in the drug screening to search a combination therapy with ruxolitinib because difference long responders and produce enough cells to perform the drug screening.

The combination ruxolutinib/nilotinib/prednisolone had a synergistic behavior in patient samples and cell lines. The affected signaling pathways were Akt/PI3K/mTOR, JAK/STAT and SRC family. The combination cancels the compensatory mechanisms (over activation of Akt, JAK/STAT and ERK) of single drug. Nilotinib has been effective inhibiting collagen I expression in bone marrow mesenchymal cells.

## RESUMEN

### Introducción

La mielofibrosis (MF) es una neoplasia mieloproliferativa crónica (NMPC) caracterizada por una proliferación clonal de la célula madre mieloide patológica y por diferentes grados de fibrosis de la médula ósea. La mutación más frecuente en MF es JAK2V617F que se encuentra en aproximadamente el 50-60% de los pacientes con MF. Las mutaciones de CALR se encuentran en un 35-50% de los pacientes. La diversidad clínica y de respuesta al tratamiento de estos pacientes no puede ser explicada con las mutaciones en JAK2, CALR y MPL. Por lo que resulta necesario el estudio de nuevas mutaciones.

Hasta la fecha, el único tratamiento específico aprobado para el tratamiento de la MF es el ruxolitinib, un inhibidor específico de JAK1/2. Ha demostrado ser un tratamiento eficaz, pero la búsqueda de tratamientos combinados con ruxolitinib responde a la necesidad de conseguir un aumento de la eficacia del tratamiento y disminución de su toxicidad.

### Objetivos

- 1.- Estudio del perfil mutacional de los pacientes de MF mediante un panel de NGS.
- 2.- Desarrollo de un modelo *ex vivo* de estudio de la respuesta a ruxolitinib y para el estudio de la sinergia de combinaciones de fármacos.
- 3.- Cribado de fármacos para la búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib para el tratamiento de la MF.
- 4.- Estudio de la sinergia, vías de señalización afectadas y acción sobre la síntesis de colágeno de la combinación elegida, ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.

### Metodología

Se ha estudiado el patrón mutacional de 27 pacientes de MF mediante NGS y con un panel de genes relacionados con la patología mieloide.

Se han establecido tres modelos *ex vivo* para el estudio de sensibilidad a fármacos y de sinergia de combinaciones en MF. Se determinó el mejor modelo para el estudio de la sensibilidad a ruxolitinib mediante una correlación de los datos de las curvas dosis-respuesta realizadas *ex vivo* con los datos clínicos de pacientes tratados con ruxolitinib.

Para la búsqueda de la mejor combinación con ruxolitinib se realizó un cribado de 28 fármacos empleando el modelo de amplificación y monitorización de las células mieloides CD13<sup>+</sup> por citometría de flujo. La combinación elegida se validó haciendo un análisis de la sinergia empleando análisis de viabilidad celular con WST-8 y análisis bioinformático calculando el índice de combinación CI. Estudio de las vías de señalización afectadas por un *array* de fosfoproteínas y posterior validación por western blot; desarrollo de líneas celulares resistentes a los fármacos elegidos y sus combinaciones. Por último se estudió el impacto sobre la expresión de colágeno en la línea derivada de células mesenquimales de médula ósea HS27a mediante qPCR e inmunocitoquímica.

## **Resultados**

El gen con el mayor frecuencia de mutación fue JAK2 (66.7%) seguido de TET2 (37.0%), ASXL1 (33.3 %), PRPF40B (22.2%), EZH2 (18.5 %) y CALR (18.5 %). Una mayor carga mutacional de JAK2 está asociado con el diagnóstico de PV-MF y una de CALR lo está con TE-MF. La mutación en al menos uno de los genes relacionado con la regulación epigenética (TET2, ASXL1, EZH2 e IDH1/2) se encuentra fuertemente asociado con el diagnóstico de la MFP y presenta una tendencia en tener duraciones de respuesta a ruxolitinib inferiores al grupo sin mutación en estos genes.

El modelo *ex vivo* de elección para el estudio de la sensibilidad a ruxolitinib sería el modelo directo, porque es el que mejor discrimina los respondedores y los respondedores de larga duración; mientras que el modelo de elección para el cribado de fármacos en la búsqueda de combinaciones con ruxolitinib es el modelo de amplificación de células mieloides, porque, además de discriminar a los respondedores de larga duración, proporciona el número suficiente de células para hacer el cribado.

La combinación ruxolitinib/nilotinib/prednisolona presentó un comportamiento sinérgico tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes de MF. Las vías de señalización que principalmente se vieron afectadas fueron Akt/PI3K/mTOR, JAK/STAT y las quinasas de la familia SRC. Los mecanismos compensatorios y de activación de las vías de señalización de Akt, JAK/STAT, ERK o SRC de los fármacos en monoterapia se ven anulados en la combinación. El nilotinib es eficaz a la hora de inhibir la síntesis de colágeno I tanto en monoterapia como en la combinación ruxolitinib / nilotinib / prednisolona.

# INTRODUCCIÓN



## INTRODUCCIÓN

### 1.- Neoplasias Mieloproliferativas Crónicas BCR/ABL negativas: Mielofibrosis.

#### **1.1.- Definición y diagnóstico.**

La mielofibrosis (MF) forma parte de las llamadas neoplasias mieloproliferativas BCR/ABL negativas o neoplasias mieloproliferativas crónicas (NMPC). Tiene una prevalencia de 4-6 casos por 100.000 habitantes y una media de supervivencia de 6.5 años después del diagnóstico. Las NMPC se caracterizan por una proliferación clonal derivada de la célula madre mieloide (1)(2). Consta de 3 entidades principales: policitemia vera (PV), trombocitemia esencial (TE) y mielofibrosis (MF) (3).

La **MF**, a diferencia de la PV y la TE, presenta fibrosis importante de la médula ósea (MO) y megacariocitos atípicos, así como dacriocitos en sangre periférica (SP). También se caracteriza por tener diversos grados de citopenias, cuadro leucoeritroblástico, hematopoyesis extramedular y hepatoesplenomegalia, así como síntomas constitucionales como pérdida de peso, sudores nocturnos, y fiebre (3)(4)(5).

Los **criterios de diagnósticos** para la mielofibrosis elaborados por la Organización Mundial de la Salud en 2008 (4) y modificados en 2016 (3) a raíz de los descubrimientos de mutaciones prevalentes como las de CALR, se presentan en la tabla 1. Para el diagnóstico de MF es necesario cumplir 3 de los criterios mayores y 2 menores.

En la nueva clasificación de 2016 se contemplan 2 subgrupos de MF, la MF en fase prefibrótica (preMF) y la MF propiamente dicha (3). Los criterios de diagnóstico para la preMF se detallan en la tabla 2.



Por otro lado, tanto la TE como la PV pueden sufrir una transformación mielofibrótica resultando en nuevas entidades denominadas post-TE MF (TE-MF) y post-PV MF (PV-MF). En la tabla 3 se describen los criterios diagnósticos (6).

Criterios mayores		
MO	1.-	Proliferación de megacariocitos atípicos normalmente acompañados de fibrosis reticulínica o colágena, si no, acompañado de aumento de celularidad, sobretodo de proliferación descenso de la eritropoyesis (fase prefibrótica)
Genética	2.-	No cumplir criterios para otras neoplasias mieloides
	3.-	Presentar mutación en JAK2, MPL, CALR u otro marcador En ausencia de marcador clonal, no evidencia de fibrosis reactiva u otra neoplasia
Criterios menores		
	1.-	Leucoeritroblastosis
	2.-	Aumento del nivel sérico de LDH
	3.-	Anemia
	4.-	Esplenomegalia palpable

**Tabla 1: Criterios diagnósticos de MF.** Se requiere cumplir los 3 criterios mayores y 2 menores. LDH: lactato deshidrogenasa; MO: médula ósea. Modificado de (3)(4).

Criterios mayores		
MO	1.-	Proliferación de megacariocitos atípicos, sin fibrosis reticulínica mayor de grado 1, acompañado de aumento de celularidad, sobretodo de proliferación granulocítica y descenso de la eritropoyesis
Genética	2.-	No cumplir criterios para otras neoplasias mieloides.
	3.-	Presentar mutación en JAK2, MPL, CALR u otro marcador En ausencia de marcador clonal, no evidencia de fibrosis reactiva u otra neoplasia
Criterios menores		
	1.-	Anemia no atribuible a alguna comorbilidad
	2.-	Leucocitosis $\geq 11 \times 10^9/L$
	3.-	Esplenomegalia palpable
	4.-	Aumento del nivel sérico de LDH

**Tabla 2: Criterios diagnósticos de MF.** Se requiere cumplir los 3 criterios mayores y 1 de los menores. LDH: lactato deshidrogenasa. Modificado de (3).

Post-TE MF	Post-PV MF
Criterios mayores	
Diagnóstico previo de TE	Diagnóstico previo de PV
Grado de fibrosis de MO 2–3 (escala 0–3) o grado 3–4(escala 0–4)	Grado de fibrosis de MO 2–3 (escala 0–3) o grado 3–4 (escala 0–4)
Criterios menores	
Anemia y $\geq 2\text{mg/ml}$ de Hb por debajo de la línea base.	Anemia o pérdida de requerimiento de flebotomías o
Cuadro leucoeritroblástico	Cuadro leucoeritroblástico
Incremento de la esplenomegalia palpable ( $\geq 5\text{cm}$ o aparición)	Incremento de la esplenomegalia palpable
Incremento de LDH respecto de la línea base	
Desarrollo de al menos uno de los siguientes síntomas: pérdida de al menos un 10% de peso en 6 meses sudores nocturnos fiebre inexplicable ( $>37.5^{\circ}\text{C}$ )	Desarrollo de al menos uno de los siguientes síntomas: pérdida de al menos un 10% de peso en 6 meses sudores nocturnos fiebre inexplicable ( $>37.5^{\circ}\text{C}$ )

**Tabla 3: Criterios diagnósticos de PV-MF y TE-MF.** Se requiere cumplir los 3 criterios mayores y 2 menores. LDH: lactato deshidrogenasa; MO: médula ósea Hb: hemoglobina; LDH: lactato deshidrogenasa. Modificado de (6).

## 1.2.- Factores pronósticos de la MF

Cervantes y colaboradores (5) elaboraron un índice pronóstico para la MF: IPSS, del inglés, *International Prognostic Scoring System*. Para ello establecieron 5 factores de riesgo evaluados al diagnóstico:

- Edad: mayor de 65 años.
- Presencia de síntomas constitucionales.
- Cantidad de hemoglobina (Hb) menor de 10 g/dL.
- Cantidad de leucocitos mayor de  $25 \times 10^9$  / Litro.
- Porcentaje de blastos mayor de 1%.

4 fueron los grupos de riesgo establecidos, desde el Bajo Riesgo sin ninguno de los factores de riesgo y Riesgo Alto con 3 o más (tabla 4).

Passamonti y colaboradores (7) desarrollaron otro índice pronóstico, el DIPSS (del inglés, *Dynamic International Prognostic Scoring System*), que utiliza los mismos factores y umbrales que el anterior, pero que se puede calcular en cualquier momento

del seguimiento del paciente. Por otra parte, otorga el doble de peso a la anemia y puede ser corregido por la edad del paciente. El índice pronóstico DIPPS Plus añade a los factores de riesgo el cariotipo, la cantidad de plaquetas y el estatus transfusional (8).

Grupo de riesgo	Nº de factores	Porcentaje de pacientes	Mediana de supervivencia
Bajo	0	22%	135 meses
Intermedio 1	1	29%	95 meses
Intermedio 2	2	28%	48 meses
Alto	> 3	21%	27 meses

**Tabla 4: Grupos de riesgo establecidos para el pronóstico de MF**, así como el porcentaje de pacientes de cada grupo y mediana de supervivencia encontrada por Cervantes y colaboradores (5) en un estudio que implicó a 1054 pacientes.

### 1.3.- *Cariotipo*

El grupo de Tefferi (9) estableció dos grupos de riesgo en función del cariotipo que presentaban los pacientes de MFP. El grupo con cariotipo desfavorable incluía los cariotipos complejos (más de 2 anormalidades), anormalidades únicas o dobles que incluyeran los reordenamientos +8, -7/7q-, i(17q), inv(3), -5/5q-, 12p- o 11q23. El grupo con cariotipo favorable incluía el cariotipo normal y aquellos que presentaran cualquier otro tipo de anormalidades como 13q-, +9, translocaciones o duplicaciones del cromosoma 1 o incluso que presentaran dos anormalidades mientras que ninguna fuera de las catalogadas como desfavorables. En el estudio que realizaron encontraron una diferencia significativa entre la media de supervivencia global de los pacientes con cariotipo favorable (5.2 años) y cariotipo desfavorable (2.0 años) (p-valor < 0.0001).

### 1.4.- Mapa mutacional de la MF

Las mutaciones en JAK2, CALR y MPL conforman casi la totalidad del panorama mutacional de los NMPc (figura 1). Todas ellas producen una activación constitutiva de la cascada de señalización citoquina/receptor/JAK2/STAT y rutas de señalización relacionadas. Parece indicar que la alteración en esta ruta promueve la aparición de fenotipo mieloproliferativo, además de que ésta puede ser la causa de que, en general, sean mutaciones mutuamente excluyentes.

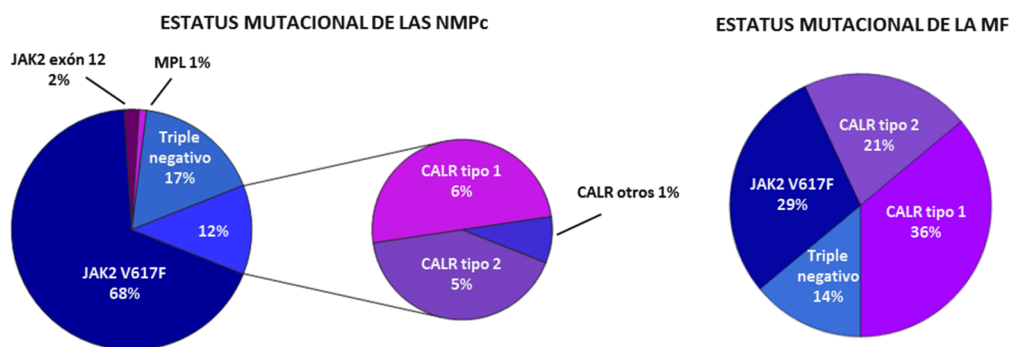


Figura 1: Frecuencias mutacionales de las NMPc y de la MF. Modificado de (10).

#### 1.4.1.- JAK2

JAK2 (del inglés, Janus Kinase 2) forma parte de la familia de Janus quinasas. Son proteínas tirosina quinasas asociadas a receptores de citoquinas. Son las encargadas de iniciar la cascada de señalización intracelular que se produce cuando el receptor se une a la citoquina y oligomeriza. Están relacionadas con procesos de desarrollo embrionario, diferenciación hematopoyética y respuestas inflamatorias (11). Otros miembros de esta familia de son JAK1, JAK3 y TYK2 (del inglés, *Tyrosin Kinasa 2*).

## 1.4.1.1.- Cascada de señalización JAK/STAT

La cascada de señalización canónica JAK/STAT comienza cuando la citoquina se une a su receptor transmembrana e induce una oligomerización de dos receptores, lo que permite la activación por fosforilación de las quinasas JAK asociadas a cada receptor. A través del dominio SH2 (del inglés, *Src homology 2*), los miembros de la familia STAT (del inglés, *signal transducers and activators of transcription*) se unen a JAK y son fosforilados en un residuo de tirosina situado entre el dominio SH2 y el dominio de transactivación TAD (del inglés, *C-terminal transactivation domain*). Entonces STAT dimeriza y se trasloca al núcleo donde se une a promotores de genes específicos (11).

JAK2 forma parte de las cascadas de señalización de la trombopoyetina (TPO), interleucina (IL)-3, GM-CSF (del inglés, *granulocyte macrophage- colony stimulating factor*) y del interferón (INF)- $\gamma$ , por lo que juega un papel muy importante en la hematopoyesis y además, su falta de expresión es letal (11)(12). La familia de proteínas STAT son las dianas de activación de JAK2. STAT3 es necesario para la cascada de señalización de IL3, GM-CSF, la hormona del crecimiento y la prolactina, entre otros (11) (figura2). STAT 5 tiene un papel fundamental en el desarrollo, diferenciación y supervivencia de células hematológicas (11). Además, la deficiencia de STAT5a y STAT5b provoca la muerte perinatal por anemia severa (11).

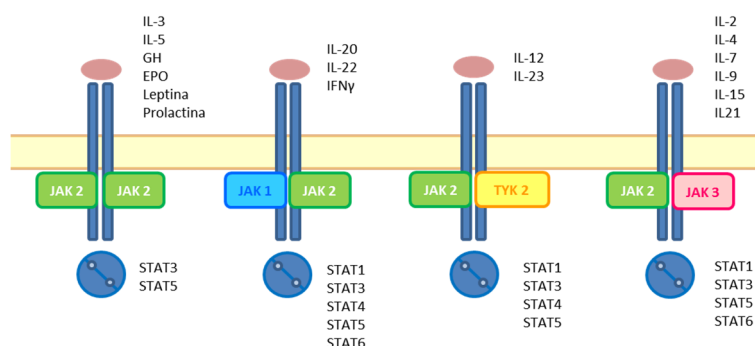


Figura 2. Cascada de señalización JAK/STAT. Modificado de (11).

Existen otras rutas de señalización conectadas con la de JAK/STAT (12) como la vía de las MAPK (del inglés, *mitogen-activated protein kinase*) o la de PI3K/Akt/mTOR (*phosphoinositide 3-kinase/ v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 2 / mammalian target of rapamycin*). Estas rutas permiten la expresión de proteínas antiapoptóticas como BclxL y Bcl2, así como proteínas de regulación del ciclo celular como la ciclina D1 o Cdc25A (figura 3).

La **regulación negativa de la cascada de señalización de JAK/STAT** se puede llevar a cabo por tres mecanismos diferentes (11) (figura 3):

- Internalización del receptor mediante vesículas endocíticas. Se produce la degradación del receptor y de JAK vía proteasoma o vía lisosomal.
- Defosforilación por fosfatasa PTP (del inglés, *protein tyrosine phosphatases*).
- Inhibición por PIAS (del inglés *protein inhibitors of activated STATs*) o por SOCS (del inglés *suppressor of cytokine signaling*).

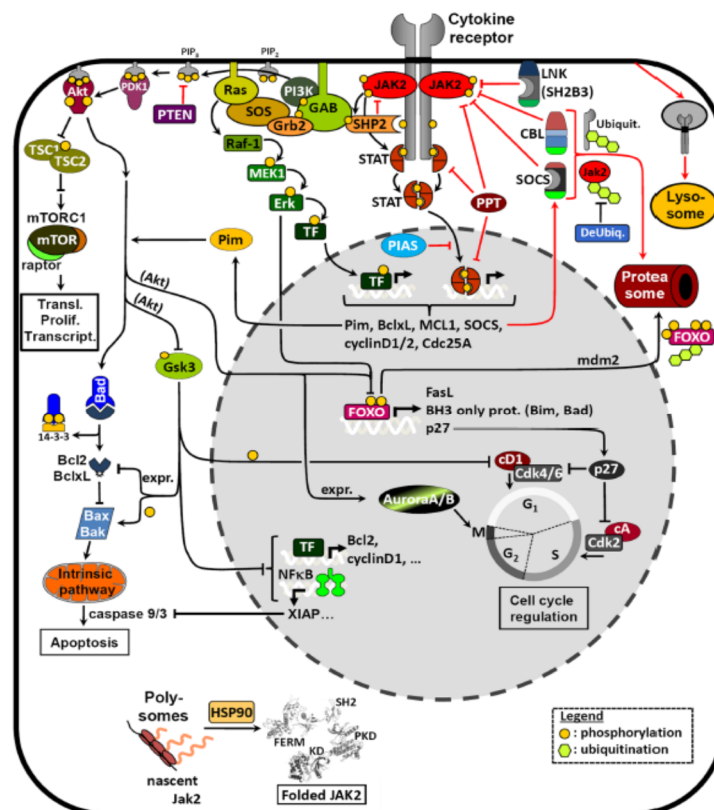


Figura 3: Representación esquemática de las vías de señalización relacionadas con la de JAK/STAT y su regulación (12).

Se encontró que JAK2 se localizaba no sólo en la membrana plasmática asociado con los receptores de citoquinas, sino también en el interior del núcleo. Esto parecía suceder en pacientes con NMPc JAK2 V617F, mientras que en pacientes con JAK2 silvestre, su localización era preferentemente en la membrana plasmática (13). JAK2, y sobre todo la forma mutada (JAK2 V617F), fosforila la proteína arginina metiltransferasa PRMT5 inhibiendo su actividad sobre histonas (H2A, H3 y H4) (14). El resultado de la fosforilación de la histona H3 era la activación de la expresión del oncogen *Imo2*(15) y *nanog* (16). El encargado de la translocación de JAK2 al núcleo es la proteína MUC16. La interacción entre ambas proteínas, MUC16 y JAK2, parece darse entre el dominio carboxilo terminal de MUC16 y el dominio FERM de JAK2 (17).

#### 1.4.1.2.- Estructura de JAK2

Todos los miembros de la familia Janus quinasa comparten 7 dominios de homología JAK (JH). Los dominios JH1 y JH2 corresponden con los dominios quinasa y pseudoquinasa, respectivamente. El resto de los dominios (JH3-7) son dominios estructurales y de unión al receptor (Figura 4).

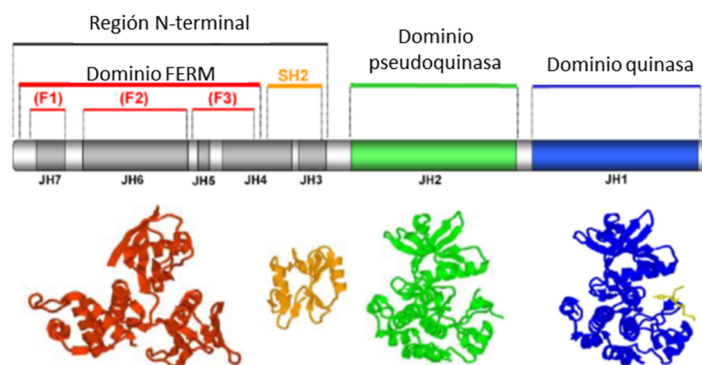


Figura 4: Esquema de la estructura de JAK2. Modificado de (18).

Para la activación del dominio quinasa es necesaria la fosforilación de dos tirosinas contiguas (1007-1008) que se encuentran formando parte del lazo de activación. Cuando estas dos tirosinas se encuentran fosforiladas, sobre todo si se trata de la tirosina 1007, el lazo de activación cambia de conformación y es expulsado del centro activo (19).

El dominio pseudoquinasa regula negativamente la actividad de JAK2 fosforilando los residuos Ser523 y Tyr570 del dominio quinasa, en ausencia de estimulación del receptor por citoquinas (20).

El resto de los dominios (JH3-7) son dominios estructurales y de unión al receptor. Dentro de ellos se encuentran el dominio SH2-*like* y el dominio trilobulado FERM. El dominio SH2-*like* parece tener una función estructural, puesto que parece no unir tirosinas fosforiladas, mientras que el dominio FERM es el encargado de la unión al dominio citoplasmático del receptor (18).

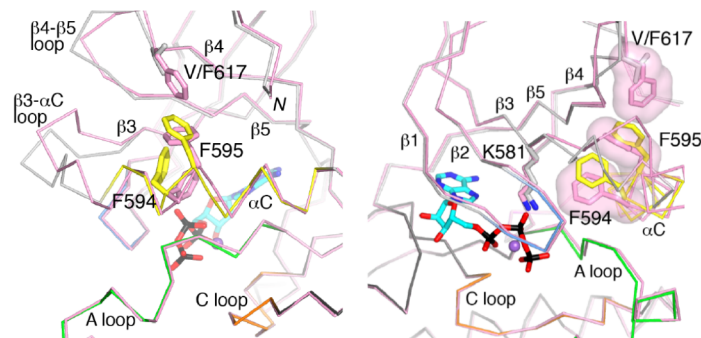
Las mutaciones con pérdida de función provocan inmunodeficiencias: las mutaciones de JAK3 provocan una pérdida de linfocitos T y células NK, función anormal de células B e hipoplasia de tejidos linfoides, dando lugar a la enfermedad inmunodeficiencia severa combinada o SCID (del inglés, *severe combined immunodeficiency disease*) (11)(18).

Las mutaciones con ganancia de función están asociadas con leucemias agudas o con NMPc. La mutación puntual V617F de JAK2 que confiere una ganancia de función a la quinasa, se encuentra en el dominio pseudoquinasa (11). Se descubrió en 2005 y se encuentra presente en la mayoría de las NMPc BCR/ABL negativas: el 90% de las PV y alrededor del 50% en TE y MF (21)(22)(23)(24)(25).

Bandaranayake y colaboradores (26) lograron dilucidar la estructura cristalina del dominio pseudoquinasa. Comparando la forma mutante V617F con la salvaje, llegaron a la conclusión de que la mutación V617F impedía la actividad catalítica del dominio pseudoquinasa, y por tanto la fosforilación de los residuos Ser523 y Tyr570 del



dominio quinasa y, de esta manera, provocaba una activación constitutiva de la quinasa JAK2 incluso en ausencia de estimulación del receptor por citoquinas (figura 5). Lo que resulta en una activación constitutiva de las cascadas de señalización relacionadas con JAK.



**Figura 5: Comparación de la estructura tridimensional de JAK2 en sus formas mutante (rosa) y salvaje (amarillo) del lóbulo N del dominio JH2.** A loop: lazo de activación; C loop: lazo catalítico. La figura b corresponde a una rotación de 90° de la figura a. Modificado de (26).

JAK2 V617F es capaz de inhibir la apoptosis mediante la ruta de PI3K / AKT / mTOR, que fosforila a FOXO3A, se exporta del núcleo al citoplasma y es degradado por el proteasoma. Las proteínas FOXO (del inglés, *forkhead box O*) están relacionadas con arresto del ciclo celular, reparación del ácido desoxirribonucleico (ADN), apoptosis y detoxificación de especies reactivas de oxígeno (27).

#### 1.4.2.-Calreticulina (CALR)

CALR es una proteína de 46 kD cuyo gen se localiza en el cromosoma 19, en la citobanda p.13.13. Tiene 9 exones y 7 intrones y comprende 4.7 kilobases (kb).

La proteína fundamentalmente se encuentra en el lumen del retículo endoplasmático, aunque también en el citoplasma, en la membrana celular y en la matriz extracelular.

Está compuesta por 3 dominios estructurales (28)(29)(30).

- Dominio N-terminal, responsable de la interacción con otras proteínas y de la actividad chaperona;

- Dominio P, rico en residuos de prolina, que participa también en la actividad chaperona y

- Dominio C-terminal, responsable de la unión a  $\text{Ca}^{++}$  funcionando como reservorio de manera que participa en la homeostasis del calcio en la célula. No olvidemos que el  $\text{Ca}^{++}$  es un importante segundo mensajero, por lo tanto, el buen funcionamiento de CALR en este punto es crucial para muchas cascadas de señalización relacionadas con la diferenciación adipogénica, el desarrollo cardíaco o la contracción muscular.

CALR también juega un papel importante en la activación de la muerte celular inmunogénica. Si es importante la exposición de la fosfatidil serina como señal de inicio de la apoptosis, la exposición de CALR en la membrana citoplasmática es una señal para la fagocitosis por las células dendríticas (28)(31).

En 2013, gracias al desarrollo de las técnicas de secuenciación masiva, se descubrió un grupo de mutaciones en CALR que afectaban aproximadamente al 12% de pacientes con NMPc y al 35-50% del total de pacientes con MFP (32)(33)(34)(10). Todas las mutaciones eran indeles del exón 9. Las dos más comunes eran delecciones de 52 pares de bases (pb) (c.1092\_1143del, L367fs\*46) o tipo 1 e inserciones de 5 pb (c.1154\_1155insTTGTC, K385fs\*47) o tipo 2. De esta manera se introduce un cambio del marco de lectura, provocando la pérdida de una parte importante del extremo C-terminal de la proteína (pérdida mayor en el caso del tipo 1) a la vez que se genera una nueva secuencia que contiene cargas positivas. Por este motivo, la extensión de la cadena perdida era diferente y por lo tanto, cada mutante conservará más o menos la capacidad de unión a calcio. Otra de las consecuencias es la capacidad adquirida de activar el receptor de trombopoyetina (TPOR)(35)(36) (aunque no del receptor de la

EPO (EPOR)) y por tanto la activación constitutiva de la señalización por la vía STAT. En MF las mutaciones de tipo 1 son las más frecuentes (34) (28) (33) (37).

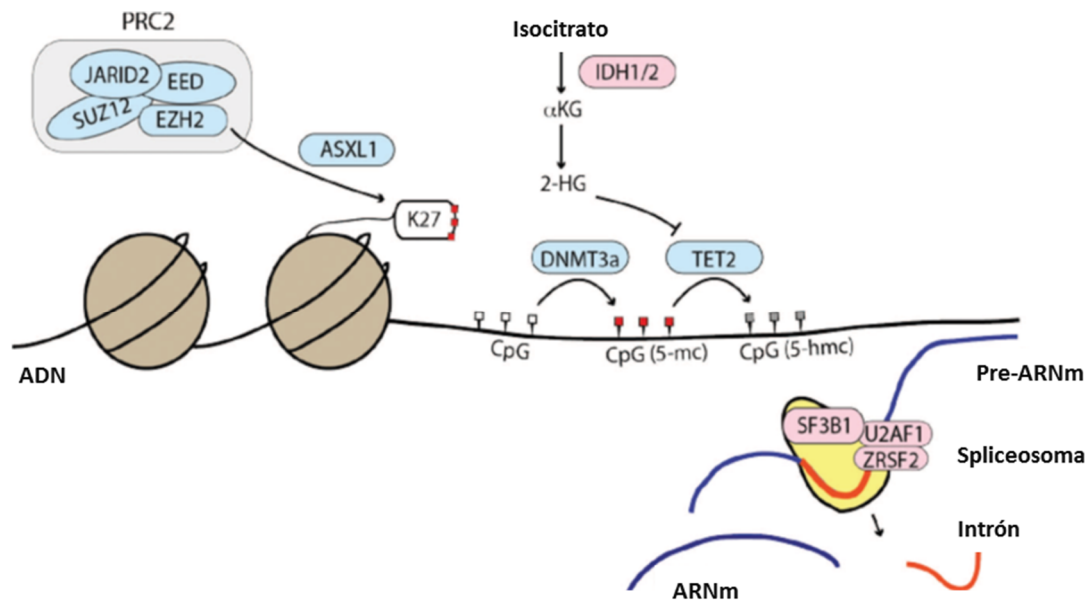
### 1.4.3.- MPL

El 1% de los pacientes con NMPc y el 3% de los pacientes que no presenta mutación en JAK2, tienen mutado MPL (del inglés, *myeloproliferative leukemia*) (10)(38). MPL es el gen que codifica para el receptor de la trombopoyetina. Las mutaciones más comunes tienen lugar en el aminoácido 515, dando lugar a las formas mutadas MPLW515L y MPLW515K. Estas mutaciones provocan una activación constitutiva del receptor y por tanto de la cascada de señalización JAK/STAT, haciéndola independiente de citoquinas (39).

Aunque la cascada de señalización activada sea la misma tanto para los mutantes JAK2 como para los de MPL, estudios en modelos murinos señalan que la mutación en MPL provoca fenotipos de TE o MF, mientras que en el caso de mutaciones en la proteína JAK2 provoca de fenotipos la PV (39).

### 1.4.4.- Otras mutaciones relacionadas con las NMPc

Las mutaciones en JAK2, CALR y MPL conforman casi la totalidad del panorama mutacional de los NMPc, pero la diversidad en las manifestaciones clínicas no se puede explicar únicamente con estas mutaciones. Hay una variedad de genes que también se encuentran mutados cuyas funciones están relacionadas con la señalización celular (LNK, CBL, N/H/K-RAS, FLT3, SH2B3), factores de transcripción (TP53, ETV6, RUNX1), regulación epigenética (TET2, DNMT3A, IDH1/2, KMT2A), estructura de la cromatina (como EZH2 o ASXL1) o *splicing* de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (SF3B1, SRSF2, U2AF1, PRPF40B, ZRSR2) (39)(37).



**Figura 6: Esquema de los procesos regulatorios de la expresión génica** mediante metilación-desmetilación de las islas CpG, control de la estructura de la cromatina mediante la modificación post-traslacional de histonas y *splicing* de ARNm.  $\alpha$ -KG:  $\alpha$ -ketoglutarato; 2-HG: 2-hidroxiglutarato; 5-MC: 5-metilcitosina; 5-hmC: 5-hidroximetilcitosina. Modificado de (39).

#### 1.4.4.1.- Variantes de proteínas relacionadas con la modificación epigenética y remodelación de la cromatina.

La metilación de las citosinas de las islas CpG es el mecanismo epigenético de regulación de la expresión génica mejor conocido y que tiene lugar tanto durante el desarrollo embrionario, como durante alteraciones neoplásicas. La ADN metiltransferasa (DNMT3A) es una de las enzimas encargadas de la metilación *de novo*. Se encuentra mutada entre el 4% y el 15% de las NMPc (39).

Por otro lado, TET2 (del inglés, *ten-eleven translocation*) es una de las proteínas que inician el proceso de desmetilación de las islas CpG oxidando la metilcitosina en hidroximetilcitosina (figura 6). Se encuentra mutada entre el 5% y el 17% de la NMPc. Participa en la regulación de la mielopoyesis y proliferación mielomonocítica. Las mutaciones en esta proteína normalmente significan una pérdida de función o

deleción de uno de los alelos, e incluso de los dos. Parece que cuando la mutación en TET2 precede a la mutación JAK2 V617F se adquiere un fenotipo de TE, mientras que cuando la primera mutación es en JAK2, el fenotipo es PV. Parece estar asociado con progresión de la enfermedad, incremento del riesgo de transformación leucémica y una menor supervivencia (39)(37).

Otra manera de regular la expresión génica mediante la modificación de la estructura de la cromatina es la modificación post-traducciona de las histonas. ASXL1 (del inglés, *Addition of Sex Combs Like 1*) y EZH2 son dos piezas importantes en la dimetilación y trimetilación de la histona 3, asociada con procesos de silenciamiento génico y compactación de la cromatina. ASXL1 parece ser crítico en la mielopoyesis, de manera que sus formas mutadas resultan en anemia severa, leucopenia, displasia, además de provocar hematopoyesis extramedular y esplenomegalia. Mutaciones de ASXL1 se encuentran tan solo entre 2% y un 10% de PV y TE; en cambio en MF, tanto primaria como secundaria a TE o PV, se encuentra en un 25%. Se ha visto en distintos estudios que, cuando las mutaciones conllevan una pérdida de función de la proteína, se asocia a una anemia severa, una mayor transformación a LMA y una menor supervivencia. El 3-13% de los pacientes con NMPc presentan mutaciones en EZH2, con mayor frecuencia en MF que en PV o TE (39)(37).

IDH1 e IDH2 (isocitrato deshidrogenasa 1 y 2) son las encargadas de las síntesis de  $\alpha$ -ketoglutarato ( $\alpha$ -KG) y 2-hidroxiglutarato (2-HG), metabolitos implicados en los procesos de regulación epigenética. Las formas mutadas de IDH1/2 llevan a una síntesis desbalanceada de ambos metabolitos, disminuyendo la síntesis de  $\alpha$ -KG, sustrato de histonas desmetilasas y ADN desmetilasas (TET2) y aumentando la síntesis de 2-HG, su inhibidor competitivo (figura 6). De manera que se previene la desmetilación de las histonas y de las islas CpG bloqueando la diferenciación celular (40). Las formas mutadas de IDH1 e IDH2 se encuentran presentes en aproximadamente el 20% de las NMPc en fase blástica y en 1-4% en las fases crónicas. (41)(39).

ATRX (del inglés, *alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked*), junto con DAXX (del inglés, *death-domain associated protein*), son chaperonas de la histona H3.3, que se encuentra en los nucleosomas de la zona telomérica de los cromosomas. En ausencia de actividad telomerásica, la longitud de los telómeros se puede mantener mediante un mecanismo alternativo que suele estar activo en el 5-15% de los cánceres y está asociado con la inactivación o pérdida de expresión de las proteínas ATRX y DAXX (42).

#### 1.4.4.2.- Variantes relacionadas con el splicing del ARNm

Los genes relacionados en el *splicing* de ARNm suelen estar mutados alrededor de un 5% de las NMPc, además de estar restringidas a TE y MF. Los genes más frecuentemente mutados son SRSF2, SF3B1 y U2AF1. SRSF2 codifica una proteína que pertenece a la familia de factores de *splicing* ricos en serina y arginina que unen las secuencias ESE (del inglés, *exonic splicing enhancer*) presentes en el pre-ARNm. Mutaciones en SRSF2 parece que alteran el reconocimiento de las secuencias ESE, de manera que se altera el *splicing* de multitud de pre-ARNm. Por esta razón, mutaciones en esta proteína suelen estar asociadas con citopenias y una disminución de una supervivencia global y supervivencia libre de transformación leucémica en pacientes (39)(37).

#### 1.4.4.3.- Variantes de factores de transcripción

TP53 es un gen supresor de tumores relacionado con la regulación de una gran variedad de procesos celulares, desde la regulación de la apoptosis y reparación del ADN, hasta la regulación del arresto del ciclo celular. Tiene una prevalencia de alrededor del 4% en MF y parece que juega un papel muy importante en el proceso de transformación de NMPc a LMA, porque se encuentra alterado en aproximadamente el 50% de los casos transformados (43)(37).

### 1.4.4.4.- Variantes de proteínas implicadas en la señalización celular

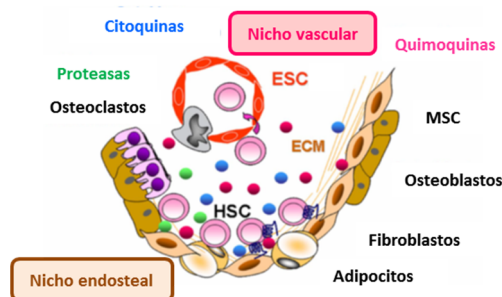
El 3-6% de las MF tienen mutada la proteína CBL (del inglés, *Casitas B-cell lymphoma*). Esta proteína regula los procesos de señalización celular mediante dos mecanismos opuestos: es una de las proteínas adaptadoras capaz de unirse a multitud de quinasas y, por lo tanto, favorece la señalización a través de multitud cascadas de señalización, como por ejemplo PI3K/Akt/mTOR, SRC, JNK, etc.; pero a la vez facilita la ubiquitinación y por tanto la degradación en el proteasoma de receptores tirosinquinasa, como por ejemplo el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR del inglés, *epidermal growth factor receptor*). También es capaz de mediar la ubiquitinación de STAT, de manera que regularía negativamente la señalización de la ruta JAK/STAT (44). En estudios preclínicos, se ha visto que las mutaciones con pérdida de función de CBL promueven la proliferación celular y generan un fenotipo oncogénico: en el caso de la LMA, mediante la inducción de la señalización por FLT3. Ratones *knock out* para CBL presentaban, además, esplenomegalia, proliferación de la célula madre hematopoyética (HSC, del inglés *hematopoietic stem cell*) y un aumento de la sensibilidad a factores de crecimiento.

Otra proteína adaptadora cuyas mutaciones están relacionadas con los fenotipos mieloproliferativos es LNK. Esta familia de proteínas une JAK2 y lo regula negativamente, por lo que juega un papel muy importante en la regulación de la hematopoyesis y su regulación por citoquinas. En estudios preclínicos se ha visto que una deficiencia en la expresión de LNK induce esplenomegalia, trombocitosis, leucocitosis, megacariopoyesis anormal y fibrosis en la médula ósea. Las mutaciones en LNK suelen ser secundarias a JAK2 V617F o mutaciones en CALR. La prevalencia en NMPc es menor al 5%, pero aumenta en los enfermos que han sufrido una transformación leucémica desde MF (37)(45).

## 1.5.- Eventos fibróticos en la médula ósea

### 1.5.1 Médula ósea: nicho hematopoyético

El nicho hematopoyético se encuentra en la médula ósea y se compone de una gran variedad de elementos, tales como los fibroblastos, osteocitos, adipocitos, osteoblastos, las células madre endoteliales (ESC, del inglés *endothelial stem cells*) y las HSC (figura 7). Estas últimas necesitan una continua interacción con los elementos del nicho para poder dividirse y diferenciarse en los diferentes linajes hematopoyéticos. Hay dos tipos de nichos dentro de la médula ósea: el nicho endosteal y el vascular. Se propone que el nicho endosteal es el encargado de mantener las HSC quiescentes y el nicho vascular, que consiste en una red de capilares fenestrados, la puerta que pone en contacto la médula ósea con el resto del organismo y donde tienen lugar las divisiones y diferenciaciones que ocurren durante la hematopoyesis (46).



**Figura 7: Esquema del nicho hematopoyético en la médula ósea**, dividido en dos subnichos: nicho vascular y nicho endosteal. ESC: del inglés, *endothelial stem cell*. ECM: Matriz extracelular, del inglés, *extracellular matrix*. HSC, del inglés, *hematopoietic stem cell*. Modificado de (46).

### 1.5.2. Eventos fibróticos

Una de las características diferenciadoras de la MF es la presencia de fibrosis en la médula ósea. La fibrosis se produce por cambios de patrones de expresión de los

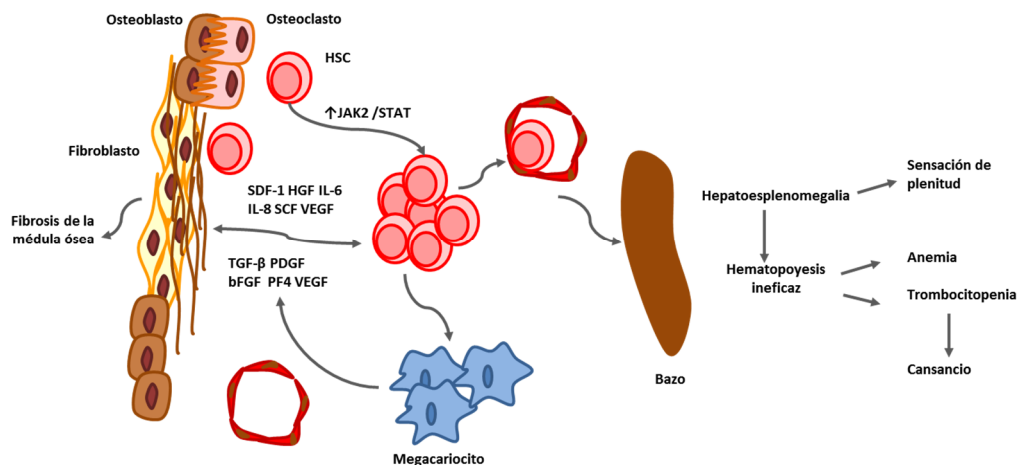


fibroblastos de la médula ósea incrementando la expresión de proteínas de la matriz extracelular como colágeno y fibronectina dando las llamadas fibras de reticulina. Este cambio de expresión se debe fundamentalmente a una excesiva producción de citoquinas y factores de crecimiento tales como PDGF (del inglés: *platelet-derived growth factor*, factor de crecimiento derivado de plaquetas), bFGF (del inglés: *basic fibroblast growth factor*, factor de crecimiento fibroblástico básico) TGF- $\beta$  (del inglés: *transforming growth factor-beta*, factor de crecimiento tranformante beta) y VEGF (del inglés: *vascular endothelial growth factor*, factor de crecimiento endotelial vascular) por parte de las células patológicas de origen mieloide, pero sobretudo, por parte de megacariocitos necróticos (46) (47).

Tanto el PDGF como el TGF- $\beta$  parecen estar aumentados en sangre periférica (48)(49)(50), e incluso se ha descrito un aumento de la expresión del ARNm de TGF- $\beta$  en los megacariocitos de los pacientes con MF (48)(49).

### **1.6.- Patogénesis**

Alteraciones en los mecanismos de señalización, fundamentalmente en la ruta de señalización JAK/STAT debidos a mutaciones en JAK2, MPL y CALR, generan una hipersensibilidad a citoquinas tales como EPO o TPO y provocan la amplificación del clon hematopoyético (46). Han y colaboradores (51) han logrado demostrar que el primer evento de alteración molecular es la mutación en las vías de señalización JAK2/STAT. Desarrollaron un modelo murino con la mutación W515L en MPL, y a partir de ella, observaron cómo se generó en cascada el resto de eventos que llevó a la fibrosis en la médula ósea y a la hepatoesplenomegalia.



**Figura 8: Esquema del mecanismo de patogénesis de la MF.**

Se produce una alteración en la comunicación entre las células estromales de la médula ósea y las células hematopoyéticas, generando un microambiente proinflamatorio que favorece la proliferación del clon hematopoyético (figura 8). Además, parece que la acción de IL-8 a través de los receptores CXCR1-2, tiene un papel muy importante en la desregulación de la diferenciación de los megacariocitos (52). Hay una amplia gama de células secretoras de IL-8 que van desde fibroblastos y células endoteliales hasta monocitos, macrófagos y los propios megacariocitos. Por lo que se propone que hay una desregulación en la comunicación bidireccional entre los distintos tipos celulares que componen el nicho hematopoyético(46).

Hay una secreción al medio extracelular de citoquinas que participan en la proliferación y movilización de las HSC (SDF-1, HGF, IL-6, IL-8, SCF, VEGF, etc.); así como en la estimulación de la fibrosis, angiogénesis y osteoesclerosis (bFGF, TGF-β, PF4, VEGF, PDGF etc.). Estas citoquinas son secretadas principalmente por megacariocitos, aunque también por HSC y monocitos así como por las células estromales de la médula ósea y el bazo (figura 8). Esto es lo que hace de la MF una enfermedad inflamatoria (46).

Debido a esta modificación, el nicho hematopoyético de la médula ósea se vuelve ineficaz para dar soporte a la hematopoyesis. Además, junto con las alteraciones en la comunicación quimoquinas-receptor y a la liberación de proteasas por parte de neutrófilos activados, las células CD34<sup>+</sup> se movilizan y van a parar a órganos extramedulares, como bazo e hígado, donde se va a producir una hematopoyesis ineficaz, lo que redundará en la presencia de hepatoesplenomegalia, anemia y leucopenia (46).

## **2.- Tratamiento farmacológico de las NMPc y de la MF**

### ***2.1.- Tratamientos farmacológicos clásicos***

#### *2.1.1- Hidroxiurea*

El fármaco más utilizado antes de la aprobación del ruxolitinib era la hidroxiurea. Su acción se centraba fundamentalmente en disminuir la esplenomegalia, aunque raramente llegaba a su resolución. Su mayor efecto secundario era la mielosupresión (2)(53).

La hidroxiurea es un antineoplásico y antiviral no alquilante. Se ha usado en una amplia variedad de enfermedades en hematología, dermatología, oncología y enfermedades infecciosas (53). Es un inhibidor de la síntesis de ADN y por tanto es activo fundamentalmente en la fase S del ciclo celular además de ser citotóxico. La diana principal de la hidroxiurea es la ribonucleosido reductasa (RNR), lo que provoca una reducción de desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTP) y ralentiza la actividad de la ADN polimerasa, lo que activa el punto de control para activar replicación de ADN y redundará en la estimulación de la RNR para intentar salir del bloqueo provocado por la hidroxiurea. Por otro lado, se inhibe la mitosis para evitar divisiones celulares aberrantes. Recientes estudios sugieren la existencia de dianas secundarias como metaloenzimas y proteasa de la matriz extracelular. Pero es la producción de especies

reactivas de oxígeno (ROS, del inglés, *reactive oxygen species*) lo que explica su poder citotóxico (53).

Parece que la hidroxiiurea puede ser sintetizada por el organismo de forma natural, probablemente gracias a la arginasa que opera en la ruta de síntesis del óxido nítrico. La concentración de esta hidroxiiurea endógena puede llegar a ser lo suficientemente alta como para poder actuar como defensa natural frente a infecciones víricas o bacterianas (53).

### 2.1.2.- Interferón- $\alpha$

Una de las opciones terapéuticas para tratar la MF es el interferón- $\alpha$  (INF- $\alpha$ ). El INF- $\alpha$  tiene un amplio espectro de mecanismos de acción. Es un efector inmune: se sugiere que estimula la actividad de células T, macrófagos, células *natural killer* (NK), ayudan a la diferenciación de células dendríticas y también incrementan la expresión de antígenos tumorales y del complejo de histocompatibilidad. También es capaz de inducir la expresión de genes proapoptóticos como la caspasa 4, caspasa 8, Fas/CD19, TRAIL (del inglés, *tumor necrosis-related apoptosis-inducing ligand*) o XIAP (del inglés, *X-linked inhibitor of apoptosis*). Por otra parte, es capaz de inhibir la proliferación de progenitores hematopoyéticos (54)(2).

En PV y TE la terapia con INF- $\alpha$  ha tenido buenos resultados, pero no ha sido así en el caso de la MF. En un pequeño estudio con 17 paciente con MFP de riesgo bajo o intermedio 1, sólo hubo una respuesta completa y siete respuestas parciales, por lo que parece que retarda la progresión de las fases tempranas de la enfermedad (55). Unida a la baja efectividad del INF- $\alpha$ , la toxicidad del fármaco es mucho mayor que en caso de PV y TE, llevando a una alta tasa de discontinuación normalmente entre los 3-6 meses en más del 50% de los pacientes. La forma pegilada del INF- $\alpha$  parece que implica menos toxicidad y mejores resultados, aunque para confirmarlo habría que usar cohortes con mayor número de pacientes (54)(2).

### 2.1.3.- Otros fármacos

Uno de los mayores problemas en el tratamiento de la MF es la presencia de anemia debida a la eritropoyesis ineficaz inherente a la MF, problema que se suele ver agravado por los tratamientos empleados para tratar la enfermedad.

Entre los tratamientos disponibles para tratar la anemia y la trombocitopenia, se encuentra los agentes estimulantes de la eritropoyesis como la EPO o la darbopoyetina- $\alpha$ . Se consigue un 23-60% de respuesta hematológica. La duración media de la respuesta es de 12 meses, y la mitad son de larga duración. Estas respuestas suelen presentarse en pacientes con niveles inadecuados de EPO y es menos frecuente en pacientes con esplenomegalias más grandes o dependientes de transfusión (56).

Otra opción es el tratamiento con andrógenos porque mejoran la anemia en un 30-60% de pacientes. El danazol es un andrógeno semisintético que presenta los mismos beneficios (40% de respuesta) que los andrógenos no sintéticos, pero con menos toxicidad que estos. La respuesta a danazol no es inmediata, se suele llegar a tardar en alcanzarla entre 3 y 6 meses. El mayor problema de toxicidad es la hepática y se da en aproximadamente el 20 % de los pacientes, pero no suele ser causa de discontinuación del tratamiento (56).

Los fármacos inmunomoduladores como la pomalidomida sería otra de las opciones, aunque todavía no está aprobado para el tratamiento de la MF. La pomalidomida (3-aminotalidomida) es un derivado de la talidomida, el más reciente de los agentes inmunomoduladores desarrollados. Posee efectos antiproliferativos y antiapoptóticos en cultivos celulares (57). En el tratamiento de la MF ofrece mejoras en la anemia y esplenomegalia, y presenta menos toxicidad que la talidomida o lenalidomida (56).

El tratamiento con corticosteroides también puede ser eficaz para tratar la anemia, como lo han mostrados estudios retrospectivos de pacientes (n=30) con anemia severa en los que otros tratamientos fallaron. El 40% de los pacientes consiguieron respuesta

hematológica mejorando la anemia. La media de duración de la respuesta fue de doce meses además de que la media de supervivencia en estos pacientes fue significativamente mayor (2)(58). Además, los corticosteroides se emplean como inmunosupresores y se ha demostrado que disminuyen los niveles de citoquinas y factores de crecimiento, entre ellas la TGF- $\beta$  (59), por lo que también tiene efectos antifibrogénicos.

## **2.2.- Inhibidores de las proteínas JAK**

La ruta de señalización JAK/STAT, como podemos deducir de lo explicado más arriba en la presente tesis, está hiperactivada en cualquiera de los estatus mutacionales posibles: mutación en MPL, JAK2 o CALR. Por lo que el uso de inhibidores de JAK2 está suficientemente justificado.

### **2.2.1- Ruxolitinib**

Ruxolitinib, inhibidor específico de JAK1/2, es la única terapia aprobada hasta la fecha para el tratamiento de la MF por la FDA (del inglés, *Food and Drug Administration*) en Estados Unidos y por la Agencia Europea del Medicamento en Europa.

Es efectivo en pacientes con MF de intermedio y alto riesgo, sean primarias, o secundarias a PV o TE y sea cual sea el estatus mutacional del paciente, edad, riesgo, cantidad de hemoglobina al diagnóstico, tamaño de bazo o síntomas. Mejora los síntomas de la MF, la esplenomegalia, así como aumenta la supervivencia global en los pacientes de riesgo intermedio y alto. En cambio, la anemia no suele mejorar, incluso empeora como efecto secundario (2).

El 97% de los pacientes tratados con ruxolitinib en el protocolo COMFORT II, ensayo clínico fase III, mostraron mejoras clínicas en algún punto del tratamiento. El 51% de

los pacientes consiguieron una disminución del volumen del bazo mayor al 35% respecto a la línea base antes de tratamiento. El porcentaje de pacientes que mantenía la respuesta esplénica a las 48 semanas fue de 73% y a la semana 144 fue de 50%. La toxicidad debida a ruxolitinib fue sobre todo hematológica (anemia, trombocitopenia y hemorragia), aunque raramente se necesitó discontinuar del tratamiento. La tasa de mortalidad del brazo de ruxolitinib fue de 19.9% mientras que la del brazo control (mejor terapia disponible) fue del 30%, con un 50% de reducción del riesgo de muerte en el brazo con ruxolitinib frente al brazo control (p-valor = 0.009)(60).

### *2.2.2- Otros inhibidores de JAK2*

Hay otros inhibidores de JAK2 que se encuentran en estos momentos en ensayos clínicos (tabla 5).

Pacritinib se encuentra en desarrollo clínico avanzado. En estudios fase III, se vio que mejoraba la respuesta esplénica respecto a la mejor terapia disponible (19.1% de pacientes tratados con pacritinib frente a 4.7% del brazo control; p-valor = 0.0003) después de 24 semanas de tratamiento. Las tasas de respuesta sintomática fueron 25% frente a 5.9% (p-valor < 0.0001) y el 25% de los pacientes tratados con pacritinib se volvieron independientes a las transfusiones, mientras que en brazo control ninguno lo consiguió (p = 0.043). Pese a todo ello, no se encontraron mejoras en la supervivencia global, por lo que no ha sido aprobado para el tratamiento de la MF (2).

Otro de los inhibidores de JAK2 que se encuentra en estos momentos en estudios clínicos fase III es el momelotinib. En los estudios fase I/II en pacientes con riesgo intermedio-2 o alto riesgo, se encontraron respuestas hematológicas del 53% y esplénicas del 39%. La media de la duración de la respuesta esplénica fue de 324 días. El más común de los efectos secundarios fue la trombocitopenia de grado 3/4 que presentó el 29% de los pacientes tratados. El 38% presentó neuropatía sensorial de grado 1/2 que mejoró después de la discontinuación del tratamiento (2).

Número de ensayo clínico	Fármaco	Fase	Comentario
NTC02101268 (SIMPLIFY1/2)	Momelotinib	III	Aparición de neuropatía periférica
NCT01423851	NS-018	I/II	Activo
NCT01773187 (PERSIST-1/2)	Pacritinib	III	No aprobado por no aumentar la supervivencia global
NCT01437787	Fedratinib	III	Retirado por desarrollo de encefalopatía de Wernicke
NCT01633372	Itacitinib	II	Activo

**Tabla 5: Lista de inhibidores de JAK2.**

### **2.3.- Combinaciones de fármacos**

Actualmente, el ruxolitinib es una opción adecuada para el tratamiento de la MF porque, además de ser la única terapia aprobada para el tratamiento de las NMPc, es el único de los inhibidores de JAK2 que ha demostrado ser eficaz en la disminución de la hepatoesplenomegalia, en la resolución de síntomas constitucionales, así como en aumentar significativamente la supervivencia global respecto las terapias convencionales. Pero por otro lado, debido a su efecto mielosupresor, es difícil tratar con dosis plenas a los pacientes, además de aumentar el riesgo de padecer infecciones y de no conseguir remisiones completas desde el punto de vista histopatológico y molecular (61).

Al igual que en otras enfermedades, la combinación de fármacos podría ser una estrategia atractiva para el tratamiento para la MF. Se han iniciado varios ensayos clínicos en combinación con ruxolitinib (tabla 6).

Una de las razones para combinar el ruxolitinib con otros fármacos es conseguir dar dosis plenas a los pacientes intentando mantener los niveles de plaquetas o la cantidad de hemoglobina.



Número de ensayo clínico	Fármaco	Fase	Comentario
NCT01693601 (PRIME Trial)	Ruxolitinib más panobinostat	I/II	Activo
NCT03069326	Ruxolitinib más talidomida	II	En reclutamiento
NCT02436135	Ruxolitinib más idelalisib	I	En reclutamiento
NCT01732445	Ruxolitinib más danazol	II	Activo
NCT02493530	Ruxolitinib más TGR-1202	I	En reclutamiento
NCT02370706	Ruxolitinib más PIM447 más LEE011	Ib	En reclutamiento
NCT01787487	Ruxolitinib más azacitidina	II	En reclutamiento
NCT02267278	Ruxolitinib más pracinostat	II	En reclutamiento
NCT01375140	Ruxolitinib más lenalidomida	II	Activo
NCT02742324	Ruxolitinib más peg-IFN alpha -2a	I/II	En reclutamiento
NCT02593760	Ruxolitinib más vismodegib	I/II	En reclutamiento
NCT01787552	Ruxolitinib más sonidegib	I/II	Activo
NCT01730248 (HARMONY)	Ruxolitinib más buparlisib	I	Activo

**Tabla 6. Lista de ensayos clínicos de combinaciones con ruxolitinib.**

Por otro lado sería interesante combinar con inhibidores de la fibrosis en médula ósea para conseguir respuesta histopatológica, como por ejemplo inhibidores de los receptores de TGF- $\beta$  y PDGF (PDGFR). El nilotinib es un inhibidor específico de la quinasa BCR/ABL y se usa como tratamiento de rutina para la leucemia mieloide crónica (LMC). Pero también es inhibidor de KIT y de PDGFR (62). Además, hay varios trabajos que indican su eficacia para la inhibición de eventos fibróticos tanto en piel (63)(64), hígado (65) y músculo (66). SB 431542 es un fármaco inhibidor de TGF- $\beta$  que parece inhibir la fibrosis pulmonar (67), pero que todavía se encuentra en fase de estudio preclínico.

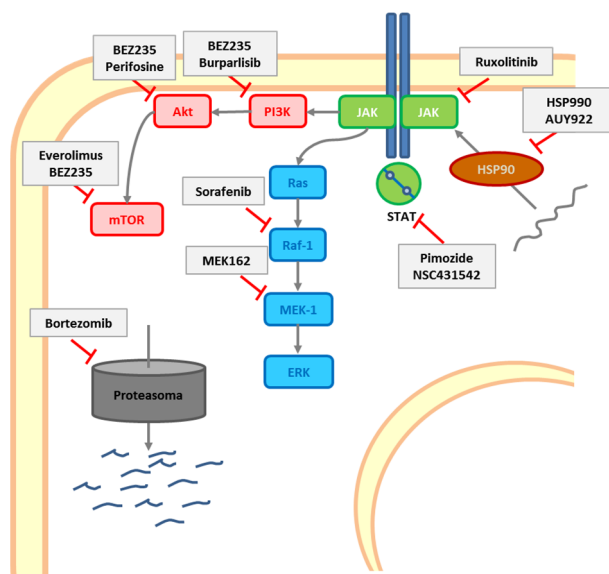
Una opción sería la utilización combinada de los inhibidores de JAK2 con el inhibidor de proteasoma, bortezomib (68) que, además, parece que en monoterapia puede inhibir la fibrosis en la médula ósea mediante la disminución de la expresión de TGF- $\beta$  (69).

Otra estrategia de combinación sería con fármacos que disminuyeran la expresión proteica de JAK2, puesto que parece ser una de las claves de las enfermedades mieloproliferativas. La chaperona HSP90 es una de las encargadas de plegar quinasas

implicadas en la señalización celular, entre ellas, JAK2. De manera que emplear inhibidores de la chaperona HSP90, como HSP990 o AUY922, podría ser una opción para disminuir la señalización de la vía JAK/STAT (70).

Por otro lado, el panobinostat, inhibidor de histona deacetilasa HDAC6, también inhibe la acción de la chaperona HSP90, por lo que parece implicar una menor expresión de JAK2 funcional, además de que la combinación con inhibidores de JAK2 parece tener un comportamiento sinérgico (71).

Otra de las opciones sería buscar eliminar por completo la señalización por la vía JAK/STAT, no sólo inhibiendo la señalización a nivel de JAK2, sino también de STAT, utilizando inhibidores de STAT como pimozide. Bar-Natan y colaboradores (72) han encontrado que ambos tratamientos potencia su acción inhibidora sobre la ruta.



**Figura 9:** Esquema de la ruta de señalización JAK/STAT y rutas de señalización relacionadas Akt/PI3K/mTOR y ruta de las MAPK y sus inhibidores específicos. La chaperona HSP90 ayuda al plegamiento de proteínas de señalización, entre ellos JAK2.

Uno de los problemas más importantes a los que hay que enfrentarse durante el tratamiento de pacientes es a la aparición de resistencias en respuesta al tratamiento. Una de las maneras de abordar el problema es el tratamiento combinado con

fármacos que actúen en diferentes rutas de señalización celular para evitar los mecanismos compensatorios (figura 9) (2).

Como por ejemplo, la combinación de inhibidores de JAK2 con inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR como BEZ235, burparlisib, perifosine o everolimus, o de la ruta de las MAPK usando sorafenib o MEK162.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 1.- FUNDAMENTOS

La MF es una NMPc caracterizada por una proliferación clonal de la célula madre mieloide patológica y por diferentes grados de fibrosis de la médula ósea, hematopoyesis extramedular que se traduce en diversos grados y tipos de citopenias. La MF, a su vez, se puede subdividir en tres clases: mielofibrosis primaria y mielofibrosis secundaria a PV o TE.

En 2005 se descubrió la mutación V617F de JAK2, en 2006 las mutaciones en MPL y en 2013 las mutaciones en CALR. Las mutaciones en estas 3 proteínas son mutuamente excluyentes y se encuentran aproximadamente en el 83% de las NMPc y el 86% de las MF. Pero la diversidad en cuanto al subtipo de diagnóstico, manifestaciones clínicas y respuesta al tratamiento no pueden ser explicados tan solo con estos tres tipos de mutaciones. Por lo que resulta necesario el estudio de nuevas mutaciones con las que se puedan explicar y describir la totalidad de los pacientes diagnosticados de NMPc y en concreto, de MF.

Hasta la fecha, el único tratamiento específico aprobado para el tratamiento de la MF es el ruxolitinib. Es un inhibidor específico de JAK1/2 y por tanto de la ruta de señalización JAK/STAT. Ha demostrado ser eficaz en la disminución de la esplenomegalia, la resolución de síntomas constitucionales además de aumentar la supervivencia global respecto a las terapias tradicionales. Pero debido a su efecto mielosupresor, provoca anemia y trombocitopenia, se hace difícil el tratamiento con dosis plenas. Por otro lado, parece que aumenta el riesgo de padecer infecciones y no consigue remisiones desde el punto de vista histopatológico y molecular.

Aunque el ruxolitinib ha supuesto un gran avance en el tratamiento de estos trastornos, la búsqueda de tratamientos combinados con ruxolitinib responde a la

necesidad conseguir el aumento de la eficacia del tratamiento y disminución de su toxicidad.

### **2.- HIPÓTESIS DE TRABAJO**

1.- Es necesario el estudio de otras mutaciones fuera de las descritas en JAK2, CALR y MPL, para explicar el subtipo de diagnóstico, la diversidad en las manifestaciones clínicas y la respuesta y duración de respuesta a tratamiento de los pacientes con MF.

2.- La búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas es clave para el tratamiento de la MF: el uso de combinaciones de fármacos, en concreto con el ruxolitinib, puede ser la forma de aumentar la eficacia del tratamiento y aumentar la duración de la respuesta al mismo.

### **3.- OBJETIVOS**

**1.- Estudio del perfil mutacional de los pacientes de MFP, PV-MF y TE-MF, mediante un panel de NGS.**

1.1.- Estudio del valor diagnóstico y pronóstico de las mutaciones encontradas.

1.3.- Correlación del perfil mutacional con la respuesta a ruxolitinib.

**2.- Desarrollo de un modelo *ex vivo* de estudio de la respuesta a ruxolitinib para:**

2.1.- El estudio de la sensibilidad *ex vivo* a ruxolitinib y correlación de la respuesta clínica.

2.2.- El estudio *ex vivo* de combinaciones de fármacos para el tratamiento de la MF.

**3.- Cribado de veintiocho fármacos en un modelo de cultivo *ex vivo* en una plataforma de citometría de flujo automatizada:**

3.1.-Búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib para el tratamiento de la MF.

**4.- Estudio de la combinación elegida, ruxolitinib, nilotinib y prednisolona:**

4.1.- Estudio del comportamiento sinérgico en la supervivencia de líneas celulares y células primarias de MF.

4.2.- Estudio de las vías de señalización afectadas.

4.3.- Estudio el efecto de la combinación sobre la síntesis de colágeno en fibroblastos de médula ósea.





# **PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS**



## PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.- Material biológico: pacientes y líneas celulares.

#### 1.1.- Pacientes:

Código	Sexo	Dx	Edad Dx	JAK2 V617F	CALR mutado	Método ex vivo	Secuenciado
P01	Femenino	MFP	64.61	SI	NO		seq
P02	Masculino	PV-MF	83.43	SI	NO	Am	seq
P03	Masculino	TE-MF	73.33	NO	SI	Am/Di/CI	seq
P04	Femenino	MFP	83.49	NO	SI		seq
P05	Masculino	TE-MF	70.83	NO	SI	Am/Di/CI	seq
P06	Masculino	MFP	70.50	NO	NO		seq
P07	Masculino	MFP	53.66	SI	NO	Di/CI	seq
P08	Femenino	PV-MF	80.17	SI	NO	Am/Di/CI	seq
P09	Femenino	PV-MF	49.29	SI	NO	Am/Di/CI	seq
P10	Masculino	MFP	60.76	SI	NO		seq
P11	Masculino	PV-MF	71.25	SI	NO	CI	seq
P12	Femenino	PV-MF	52.39	SI	NO		seq
P13	Masculino	MFP	73.56	SI	NO		seq
P14	Masculino	MFP	62.16	SI	NO	CI	seq
P16	Femenino	MFP	78.99	SI	NO		seq
P17	Masculino	MFP	78.04	SI	NO		seq
P18	Masculino	MFP	76.97	SI	NO		seq
P19	Femenino	PV-MF	66.25	SI	NO	CI	seq
P20	Masculino	MFP	46.86	NO	SI	CI	seq
P21	Masculino	PV-MF	63.68	SI	NO		seq
P22	Masculino	MFP	71.95	SI	NO		seq
P24	Femenino	MFP	58.70	SI	NO	Am/Di/CI	seq
P25	Masculino	MFP	83.02	SI	NO	Am/Di	seq
P26	Masculino	TE-MF	72.36	NO	SI	Am/Di/CI	
P27	Masculino	MFP	75.15	SI	NO	CI	
P28	Masculino	MFP	66.04	NO	SI		seq
P29	Masculino	MFP	62.79	NO	NO	CI	seq
P30	Masculino	PV-MF	55.16	SI	NO		seq
P31	Femenino	MFP	61.25	SI	NO	Am	
P32	Masculino	MFP	53.81	SI	NO	Di	
P33	Femenino	MFP		SI	NO	CI	
P34	Masculino	MFP		SI	NO	CI	

Tabla 7. Lista de pacientes cuyas muestras han sido utilizadas para alguno de los estudios de la presente tesis. TE-MF: Mielofibrosis post Trombocitemia Esencial; PV-MF: Mielofibrosis post Policitemia Vera; PMF: Mielofibrosis Primaria; Am: modelo de amplificación de células mieloides; Di: modelo directo; CI: modelo clásico.

Se estudiaron 32 casos de pacientes diagnosticados de MF según los criterios de las OMS 2016, 21 eran MF primarias y 11 secundarias, diagnosticados en el hospital 12 de Octubre. Todos los enfermos firmaron consentimiento informado de acuerdo con la declaración de Helsinki. Las características de los pacientes y para qué estudio fueron empleadas las muestras de cada uno de ellos, se detallan en la tabla 7.

### **1.2.- Líneas celulares:**

**BA/F3:** Línea celular de células pro-B murinas. En el presente trabajo, empleamos la línea celular transfectada con el gen JAK2 con la mutación V617F (BA/F3 JAK2 V617F), como la forma silvestre (BA/F3 wt), ambas cedidas por el laboratorio del doctor Quintás-Cardama desde el MD Anderson *Cancer Center*, Houston, Texas, Estados Unidos. Ambas se cultivaron en RPMI (Roswell Park Memorial Institute, Biowest, Nuaille, Francia) con 10% de suero fetal bobino (FBS del inglés, *Fetal Bovine Serum*; Hyclone Laboratories, San Angelo, Texas, Estados Unidos). La forma silvestre es dependiente de la presencia de IL3, por lo que se cultivó con un 10% de medio condicionado procedente de la línea celular WEHI-3B.

**WEHI-3B:** Línea celular murina derivada de una leucemia mielomonocítica. Son células productoras de IL-3. Se cultivaron en DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; Biowest, Nuaille, France) 10% FBS. Cedida por el laboratorio de Quintás-Cardama (MD Anderson, Houston, Texas, EEUU).

**SET2:** Línea celular humana derivada de un paciente de TE transformada en leucemia megacariocítica. Presenta la mutación V617F en JAK2. Se cultivó en RPMI 20% FBS y fue adquirida en DSMZ, Braunschweig, Alemania.

**HS27a:** Línea celular humana derivada del estroma de la médula ósea, inmortalizada con el virus del papilomavirus 16 (HPV-16) E6/E7. Constituyen células adherentes y fueron cultivadas en DMEM 10% FBS. También fue adquirida en DSMZ.

## **2.- Secuenciación de Nueva Generación (NGS) de un panel de genes relacionados con patología mieloide.**

Se secuenciaron muestras de ADN de sangre periférica de 27 pacientes con patología mielofibrótica, tanto primaria como secundaria a TE o PV. El diagnóstico se llevó a cabo según los criterios de las OMS 2016. Los pacientes elegidos tuvieron que cumplir con los siguientes requisitos: 1) disponibilidad de la muestra de ADN, 2) disponibilidad de datos clínicos. Las muestras procedían del Biobanco de muestras del Servicio de Hematología del Hospital 12 de Octubre.

El panel empleado para la secuenciación consistió en 1257 amplicones con una longitud aproximada de 90 y 140 pares de bases (pb) que cubren la región codificante de 36 genes relacionados con el diagnóstico y pronóstico de las patologías mieloides (tabla 8). El desarrollo de los amplicones lo llevó a cabo Life Technologies (Palo Alto, CA, USA).

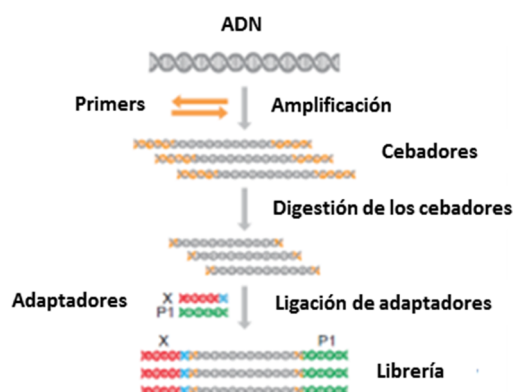
Gen	Cromosoma	Gen	Cromosoma
MPL	1	LNK	12
NRAS	1	PRPF40B	12
DNMT3A	2	FLT3	13
IDH1	2	IDH2	15
SF3B1	2	SRSF2	17
VHL	3	TP53	17
KIT	4	CALR	19
TET2	4	EPOR	19
EZH2	7	ASXL1	20
JAK2	9	RUNX1	21
PTEN	10	U2AF35	21
CBL	11	SF3A1	22
HRAS	11	KDM6A	X
MLL	11	PHF6	X
SF1	11	ZRSR2	X
MPL	11	ATRX	X
ETV6	12	GATA	X
KRAS	12		

**Tabla 8. Genes secuenciados**

## 2.1.-Preparación de las librerías

El primer paso fue la preparación de las librerías: consistió en la amplificación de los genes de interés mediante cebadores específicos y la colocación de unos códigos de muestra (figura 10).

Se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial, Life Technologies.



**Figura 10. Esquema del flujo de trabajo para la obtención de librerías.** Modificado del manual de usuario para la preparación de librerías Ion AmpliSeq™ (Life Technologies).

### 2.1.1.- Medición de la cantidad de ADN de las muestras

Se realizó una medición fluorimétrica empleando el kit comercial Qubit™ (Qubit dsDNA HS Assay Kit, Life Technologies). Se preparó la solución de trabajo diluyendo 200 veces el reactivo *Qubit® dsDNA HS Reagent* en el tampón *Qubit® dsDNA HS Buffer*. Para la preparación de los estándares de 0 y 10 ng/μL, se añadieron 190 μL de la solución de trabajo a 10 μL de los mismos. En el caso de las muestras, se mezclaron 199 μL de solución de trabajo y 1 μL de muestra. Se agitó y se incubó durante 2 minutos a temperatura ambiente. La lectura de la fluorescencia se realizó en el fluorímetro Qubit® 2.0 (Invitrogen, Life Technologies). Primero se calibró el aparato con los estándares y posteriormente se midió la fluorescencia de las muestras. Se llevaron las muestras a una concentración de 10 ng/μL.

### 2.1.2.- Amplificación de las dianas de secuenciación

En el paso de la amplificación se emplearon dos grupos de cebadores de los genes especificados en la tabla 8. Por cada grupo y muestra se preparó una mezcla de reacción con 15 ng de ADN (tabla 9). La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) se realizó en el termociclador Veriti 96 well Thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, California, United States) con el programa detallado en la tabla 10. Se mezclaron los dos productos de PCR obtenidos por cada muestra para continuar con los siguientes pasos.

Reactivos	Volumen (μl)
5X Ion AmpliSeq™ HiFi Mix	2
DNA (10ng/μL)	1.5
Agua libre de DNAsas	1.5
Grupo de cebadores	5
<b>Volumen Total</b>	<b>10</b>

Tabla 9. Mezcla de reacción de la PCR de amplificación de amplicones.

Paso	Tiempo	Temperatura
<b>Activación de la enzima</b>	2 min	99 °C
<b>Desnaturalización</b>	15 s	99 °C
<b>PCR (18 ciclos)</b>	<b>Alineamiento /</b>	<b>4 min</b>
	<b>Elongación</b>	<b>60 °C</b>

Tabla 10. Programa de la PCR de amplificación de los amplicones.

### 2.1.3.- Digestión parcial de los cebadores

Se añadió 1 μL del reactivo FuPa (Life Technologies) al producto de la PCR anterior. Se volvió a introducir en el termociclador Veriti 96 well Thermal cycler y se corrió programa especificado en la tabla 11:



Paso	Tiempo	Temperatura
1	10 min	50 °C
2	10 min	55 °C
3	20 min	60 °C

Tabla 11. Programa de la PCR para la digestión parcial de los cebadores.

#### 2.1.4.- Ligación de los adaptadores

Al secuenciar simultáneamente varias muestras, fue necesario marcar los fragmentos de cada muestra con un código identificativo (*Ion Xpress™ Barcode X*, BC). La mezcla de preparación de cada código identificativo con los adaptadores (*Ion P1 Adapter*) necesarios para la ligación se detalla en la tabla 12.

Reactivos	Volumen (μL)
Ion P1 Adapter	2
Ion Xpress™ Barcode X	2
Agua libre de DNAsas	4
<b>Total</b>	<b>8</b>

Tabla 12. Preparación de la mezcla Ion P1 Adapter e Ion Xpress™ Barcode X (BC). X es el número del código.

La mezcla de ligación se preparó añadiendo 2 μL de *Switch Solution*, 1 μL de BC y 1 μL de ligasa a los tubos de PCR con el producto procedente del paso anterior. Se volvió a introducir todo otra vez en termociclador (Veriti 96 well Thermal cycler) y se ejecutó el programa de ligación (tabla 13). El producto obtenido fueron las librerías.

Paso	Tiempo	Temperatura
1	30 min	22 °C
2	10 min	72 °C

Tabla 13. Programa de la PCR para la ligación de los BC.

### 2.1.5.- Purificación de la librería

Para proceder a la purificación de las librerías se empleó el reactivo *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent* (Life technologies). Está compuesto por bolas magnéticas que se unen a los amplicones de las librerías de manera específica. Se añadió un volumen de *Agencourt™ AMPure™ XP Reagent* igual a 1.5 veces al volumen del producto de reacción del paso anterior y se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se empleó un imán para poder lavar las bolas unidas a las librerías con etanol al 70%. Después de realizar los lavados se dejaron secar las bolas para luego eluir las librerías en 25 µL de *Low TE* (Life technologies): las bolas se quedaron retenidas por el imán y el eluido se retiró con cuidado de no arrastrar ninguna bola.

### 2.1.6.- Cuantificación de las librerías mediante qPCR

Se usó el Ion Library TaqMan® Quantitation Kit. Previamente se diluyeron las librerías 100 veces. Después se preparó la mezcla de reacción detallada en la tabla 14. Para poder realizar una cuantificación absoluta se emplearon unos estándares para construir una recta patrón. Tanto las librerías como los estándares se analizaron por duplicado.

El termociclador empleado en este caso fue el 7900HT Fast Real-Time PCR Systems (Applied Biosystems) y el programa fue el detallado en la tabla 15.

En este punto hubo que dejar cada librería a 100pM para poder juntar las librerías correspondientes a las muestras que se pretendían secuenciar de librerías y así poder realizar la secuenciación. Guardamos a -20°C hasta el día de la secuenciación.

Reactivos	Volumen (µl/muestra)
2X TaqMan® MasterMix	5.5
20X Ion TaqMan® Assay	0.5
Librería	4.5

Tabla 14. Mezcla de reacción de la qPCR para la cuantificación de las librerías.

Paso	Tiempo	Temperatura
Activación de la enzima	2 min	50 °C
Activación de la enzima	10 min	95 °C
Desnaturalización	15 s	95°C
Alineamiento / Elongación	1 min	60 °C

Tabla 15. Programa de la qPCR para cuantificación de las librerías.

## 2.2.- Secuenciación.

La secuenciación se llevó a cabo en el servicio de secuenciación de la Fundación de Investigación del Hospital Universitario 12 de Octubre. Se utilizó el *Ion Chef™ System* para preparar las librerías obtenidas en el paso anterior y cargarlas en el chip. Para la secuenciación propiamente dicha se utilizó el secuenciador *Ion Proton™*.

Brevemente, se programó el *Plan Run* en el *Torrent Suite™ Software* seleccionando el kit que se iba a utilizar (*Ion PI™ IC 200 Kit*), el chip (*Ion PI™ v2 BC Chips*), el tipo de librería (*Ion Ampliseq*) y la correspondencia de cada *BC* con la muestra que corresponde. Se preparó el *Ion Chef™* con los consumibles adecuados, entre ellos el chip y se introdujo la mezcla de librerías. El software del *Ion Chef™* comprueba que todo esté bien preparado antes de comenzar. Al término del proceso se obtuvo el chip cargado con las librerías. Después de limpiar e inicializar se procedió a la carga del chip en el secuenciador *Ion Proton™*. Antes de comenzar la carrera se escaneó el código de barras del chip para asociar los datos que se obtuvieran en la carrera con el chip correspondiente.

## **2.3.- Análisis de las variantes encontradas**

### **2.3.1.- Filtro de las variantes**

De todas las variantes detectadas por el *Ion Reporter* versión 4.4 se filtraron:

- De las variantes debidas a un cambio de base, se eliminaron las sinónimas, las intrónicas y las que se encontraban en la zona UTR.
- De los indeles de una base, se eliminaron las que se encontraban en regiones intrónicas y zona UTR.
- Se eliminaron los posibles polimorfismos filtrando las variantes con una MAF (del inglés, *minor allele frequency*) por encima de 1 por 100.

Por último, revisamos la variantes una a una en el programa IGV para eliminar los posibles fallos de secuenciación y secuencias mal alineadas.

Se consideraron positivas las variantes que estuvieran por lo menos en un 3% y al menos en 7 lecturas.

## **2.4.- Recogida de datos clínicos**

Los datos clínicos se recogieron de las historias clínicas electrónicas de cada paciente. Se recogieron tanto datos demográficos (sexo, edad al diagnóstico y tipo de diagnóstico), como datos clínicos (cantidad de hemoglobina (Hb) (g/L), de plaquetas (número de plaquetas /mm<sup>3</sup>), presencia de esplenomegalia y grado de fibrosis de la médula ósea al diagnóstico), además de la fecha de diagnóstico, fecha de inicio de tratamiento, tipo de tratamiento, fecha de fin de seguimiento por transformación a leucemia mieloide aguda (LMA), muerte o última consulta. La descripción de los datos clínicos se realizó aportando la media y desviación estándar o la mediana y rango intercuartil.

	Opciones de respuesta	Parámetros de respuesta		
Respuesta completa RC	A	Médula ósea	Normocelularidad  < 5% blastos ≤ MF1	
		Sangre periférica	100 g/L ≤ <b>Hb</b> < LSN 10 <sup>9</sup> /L ≤ <b>N</b> < LSN 100x10 <sup>9</sup> /L ≤ <b>P</b> < LSN < 2% células mieloides inmaduras	
		Clínica	Resolución de síntomas constitucionales Bazo e hígado no palpable No evidencia de HEM	
Respuesta Parcial RP  (dos opciones)	A	Sangre periférica	100 g/L ≤ <b>Hb</b> < LSN  10 <sup>9</sup> /L ≤ <b>N</b> < LSN 100x10 <sup>9</sup> /L ≤ <b>P</b> < LSN < 2% células mieloides inmaduras	
		Clínica	Resolución de síntomas constitucionales Bazo e hígado no palpable No evidencia de HEM	
	B	Médula ósea	Normocelularidad < 5% blastos ≤ MF1	
		Sangre periférica	85 g/L ≤ <b>Hb</b> < 100 g/L y < LSN 10 <sup>9</sup> /L ≤ <b>N</b> < LSN 50x10 <sup>9</sup> /L ≤ <b>P</b> < 100 g/L y < LSN < 2% células mieloides inmaduras	
		Clínica	Resolución de síntomas constitucionales Bazo e hígado no palpable No evidencia de HEM	
	Mejoría Clínica MC  (tres opciones)	Mejora de la anemia	Pacientes con independencia transfusional	Aumento Hb > 20g/L
			Pacientes con dependencia transfusional	Volverse transfusión-independientes
Respuesta esplénica		Línea base 5-10 cm (bazo palpable)	Conseguir un bazo no palpable	
		Línea base > 10 cm (bazo palpable)	Reducción de ≥ 50%	
	Respuesta sintomática	Línea base < 5 cm (bazo palpable)	No elegible para respuesta esplénica	
		Reducción de > 50% Sin presión de la enfermedad o Aumento de la severidad de la anemia, trombocitopenia o neutropenia.		

**Tabla 16. Criterios de respuesta a tratamiento (73).** LSN: límite superior de la normalidad; HEM: hematopoyesis extramedular.

Los criterios de respuesta elegidos fueron los publicados por Tefferi y colaboradores en 2013 (73) que están recogidos en la tabla 16.

### **2.5.- *Análisis estadístico:***

El análisis estadístico se realizó con STATA 13.1 (StataCorp, College Station, Texas, EEUU). Cuando las variables tanto dependiente como independiente fueron categóricas, se empleó el test exacto de Fisher porque, debido al reducido tamaño muestral, al menos una de las frecuencias esperadas era menor de 5. Cuando fue necesario descomponer un análisis para buscar el responsable de la significación, se corrigieron los p-valores resultantes mediante la corrección de Holm.

Cuando las variables dependientes fueron cuantitativas se aplicaron test no paramétricos, como el de la prueba de aleatorización de Fisher-Pitman si la variable independiente era binaria y el de Kruskal-Wallis si era categórica debido al reducido tamaño muestral. Cuando tanto la variable independiente como la dependiente fueron cuantitativas, se comprobó el supuesto de linealidad y después se realizó una regresión lineal.

Para realizar el análisis de supervivencia, se calculó la supervivencia global desde la fecha del diagnóstico hasta la fecha de muerte o hasta la fecha de transformación a LMA o último seguimiento (datos censurados). Se empleó el método de Kaplan-Meier para estimar la supervivencia y la regresión de COX para determinar los riesgos relativos (RR).

### **3.- Estudio de la sensibilidad del ruxolitinib ex vivo**

Se realizó un estudio de sensibilidad *ex vivo* a ruxolitinib empleando modelos diferentes para el cultivo *ex vivo* de células mononucleadas de sangre periférica de

pacientes diagnosticados de MF. El objetivo era ver cuál de los modelos estudiados correlacionaba mejor con la respuesta clínica, para poder establecer un modelo *ex vivo* para el estudio de sensibilidad a fármacos y para los estudios de sinergias que se realizaron posteriormente.

Los modelos empleados fueron tres: modelo directo, en el que se trató la sangre directamente con los fármacos, el modelo de amplificación del número de células mieloides, en el que se intentó aumentar el número de células sembrándolas previamente en metilcelulosa y el modelo clásico, en el que se sembró y trató con fármacos directamente en metilcelulosa.

### **3.1.- Método directo**

Con este método lo que se pretendió fue conservar el nicho celular de la sangre periférica. Las muestras de sangre periférica fueron sembradas directamente en placas de 96 pocillos a razón de 4000-8000 células CD34<sup>+</sup> vivas por pocillo. Estas placas contenían concentraciones crecientes de ruxolitinib (4.6nM-10μM) con hasta 0.5% de DMSO (dimetilsulfóxido) como vehículo. La incubación se realizó durante 48-72 horas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo se añadió una solución basada en amonio clorhídrico (20 mM KHCO<sub>3</sub>, 310 mM NH<sub>4</sub>Cl, 254 μM EDTA) para lisar los hematíes. En este punto se realizó una citometría de flujo multiparamétrica (CFM) con la plataforma automatizada ExviTech empleando anexina V-PE (del inglés, *phycoerythrin*) y CD 34-PerCP (Del inglés, *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*) (Becton, Dickinson and Company), para analizar el número de células CD34<sup>+</sup> viables después del tratamiento.

### **3.2.- Modelo clásico**

En este modelo se sembró en metilcelulosa y se trató con ruxolitinib simultáneamente. Para ello se separaron las células mononucleadas mediante centrifugación en

gradiente de densidad con Ficoll (Ficoll-Paque TM Plus, GE Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) y se sembraron posteriormente en metilcelulosa (Methocult TM GF\_H4535, StemCell Technologies, Grenoble, France) suplementada con 20 ng/mL de IL-3 y 50 ng/mL de SCF (del inglés, *Stem Cell Factor*) en concentraciones crecientes de ruxolitinib (1.28 nM-20  $\mu$ M) cordialmente donado por Novartis (Novartis Pharma, Basilea, Switzerland) con hasta 0.3 % de DMSO como vehículo. Después de 13-15 días de incubación a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>, se lavaron las células con PBS (del inglés, *phosphate buffer saline*) para poder realizar la CFM con anexina V-PE y CD13 (clone WM15)- APC (del inglés, *allophycocyanin*) (BioLegend, San Diego, CA) para analizar el número de células mieloides viables.

### 3.3.- Modelo de amplificación celular

Este método está a caballo entre los dos modelos descritos anteriormente. Lo que se pretendió fue incrementar el número de células de la muestra para poder realizar los estudios de sensibilidad a fármacos. Brevemente, se sembraron las células mononucleadas de sangre periférica aisladas mediante centrifugación por gradiente de densidad en metilcelulosa, como se hizo en el modelo clásico, pero sin tratar con fármacos. Se incubó durante 13-15 días y después se extrajeron las células del cultivo lavándolas con PBS y se pasaron a placas de 96 pocillos, esta vez sí, en presencia de concentraciones crecientes de ruxolitinib (4.6nM-10 $\mu$ M) con DMSO como vehículo y hasta una concentración final del mismo de 0.5%, en RPMI 10% FBS. Después de 72 horas de incubación con ruxolitinib se realizó la CFM con anexina V FITC (del inglés, *fluorescein isothiocyanate* (FITC) (Immunostep, Salamanca, Spain) y CD13-APC, empleando la plataforma automatizada de citometría de flujo Exvitech.

Tanto en el modelo directo como en el de amplificación, la siembra en presencia de fármacos y la citometría de flujo se realizó en la empresa biotecnológica Viviva Biotech. El resto se llevó a cabo en el Hospital 12 de Octubre.



### **3.4.- Recogida de datos clínicos.**

Se estudió la correlación de los parámetros de respuesta a ruxolitinib en pacientes de MF tratados con dicho fármaco. Para ello se emplearon los criterios de respuesta publicados por Tefferi y colaboradores en 2013 (73) como se indica en el apartado 2.4 de la presente tesis.

### **3.5.- Análisis bioinformático y estadístico de los resultados.**

El análisis de las curvas dosis respuesta a fármacos se llevó a cabo con el programa informático GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, La Jolla California USA, [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) empleando el modelo de regresión no lineal (ecuación 1)

[Ecuación 1] 
$$E = E_0 + \frac{E_{max} - E_0}{1 + 10^{(logIC_{50} - C) * \gamma}}$$

Donde X es la concentración del fármaco,  $E_{max}$  es la eficacia máxima en términos de supervivencia,  $E_0$  es la supervivencia cuando sólo se aplicó DMSO, el vehículo en el que disolvió el fármaco,  $EC_{50}$  es la concentración de fármaco en la cual se consigue en 50 % de la acción total del fármaco y  $\gamma$  es la pendiente. También se calculó el área bajo la curva (ABC), un parámetro que integra tanto la potencia como la eficacia del fármaco.

El análisis estadístico se realizó, como en el apartado anterior, con el programa STATA. Se describieron los datos de respuesta a tratamiento en pacientes tratados con ruxolitinib con el método de Kaplan-Meier y haciendo regresión lineal no paramétrica de Spearman para ver la correlación entre los distintos tipos de pacientes respondedores en términos de duración del tratamiento y los parámetros que describen las curvas dosis respuesta de los experimento *ex vivo* ( $E_{max}$ ,  $EC_{50}$  y ABC).

**4.- Búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib: cribado de fármacos**

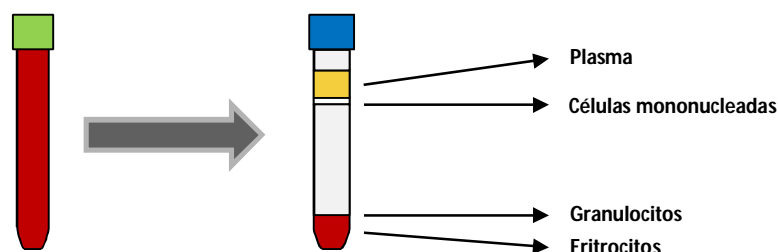
Para la búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib se empleó un panel de 28 fármacos (tabla 17). Estos fármacos tienen dianas que inhiben distintos puntos de rutas de señalización relacionadas con crecimiento, supervivencia celular y síntesis de citoquinas; otros fármacos inhiben puntos clave del metabolismo y funcionamiento celular como son el proteasoma, metaloproteasas, chaperonas, histonas deacetilasas; y por último, fármacos empleados en el tratamiento de enfermedades mieloproliferativas de manera habitual.

Fármaco		Compañía/ Casa comercial	Diana
Ruxolitinib	INCB18424/INC424	Novartis	Inhibidor Jak 1/2
Nilotinib	AMN 107	Novartis	Inhibidor de PDGF-R, c-kit y BCR/ABL
Midostaurin		Novartis	Inhibidor de FLT3
Bosutinib		Selleck	Inhibidor de quinasas Abl y Src
Perifosine		Selleck	Inhibidor de AKT
SP600125		Selleck	Inhibidor de la ruta de JNK
MEK162		Novartis	Inhibidor de MEK
Sorafenib		Selleck	Inhibidor de RAF
Buparlisib	BKM120	Novartis	Inhibidor de PI3K
BEZ235		Novartis	Inhibidor de PI3K/Akt/mTOR
Everolimus	RAD001	Novartis	Inhibidor de mTOR
Sonidegib	LDE225	Novartis	Inhibidor de Smo (Inhibidor de la ruta de señalización Hh)
Pimozide		Tocris	Inhibidor de STAT 3
NSC 74859	S31-201	Selleck	Inhibidor de STAT 3
SB 431542		Selleck	Inhibidor del receptor de TGF-beta
Ponatinib	AP24534	Selleck	Inhibidor de FGFR, BCR/ABL
Bortezomib		Selleck	Inhibidor del proteosoma
Marimastat		Tocris	Inhibidor de MMP
KNK437		Calbichem	Inhibidor de Heat Shock Protein
Panobinostat	LBH589	Novartis	Inhibidor de histonas deacetilasas (HDAC)
HSP990		Novartis	Inhibidor de HSP90
AUY922		Novartis	Inhibidor de HSP90
Alfa interferon		Preprotech	Inmunomodulador
Pomalidomide		Selleck	Agente inmunomodulador antineoplásico
Prednisone		Selleck	Inmunosupresor
Anagrelide		Tocris	Inhibidor de PDE3 (fosfodiesterasa 3)
EPO		Stem Cell	Agonista de la EPO
Danazol		Sigma	Actividad antigonadotrópica y anti-estrogénica

**Tabla 17. Panel de fármacos para la búsqueda de terapia combinada con ruxolitinib.**

#### 4.1.- Procesamiento de la muestra y análisis por citometría de flujo

Para el procesamiento de la muestra, se separaron las células mononucleadas de 6-10 mL de sangre periférica mediante una centrifugación en gradiente de densidad (Ficoll-Paque™ PLUS, GE Healthcare), a 300 g durante 30 minutos sin freno de parada y a 4°C. Las mononucleadas se encontraban en la fracción entre la fase de ficoll y la de plasma (figura 11).



**Figura 11: Centrifugación en gradiente de densidad de sangre periférica para la separación de células mononucleadas.**

Las células mononucleadas se lavaron con PBS para eliminar los posibles restos de ficoll. Se centrifugaron a 250 g, 5 minutos. Después se resuspendió en 1-4 mL de IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium; Biowest, Nuaille, France) y se realizó un conteo de células viables con azul tripán (Gibco, ThermoFischer Scientific, Waltham, Massachusetts, United States). Este cultivo se puso a  $4.4 \times 10^6$  células/mL. Así, al añadirse 1.3 mL de cultivo a alícuotas de 13 mL de metilcelulosa Methocult TM GF\_H4535 suplementada con 20 ng/mL de IL3 y 50 ng/mL de SCF, se quedaron a una concentración celular final de  $0.4 \times 10^6$  células/mL (Methocult TM GF\_H4535, IL3 y SCF fueron adquiridos en Stemcell™ technologies, Vancouver). Se sembraron entre 6 y 12 placas *petri* de 35 mm de diámetro con 2 mL de cultivo cada uno. Se incubaron durante 12-14 días a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Después de este tiempo, se recogieron las colonias resultantes con 10 mL de PBS por cada 2 mL de metilcelulosa, se centrifugó a 300g, 10 minutos y se resuspendió en IMDM 10% FBS. En Vivia Biotech se realizó el estudio de sensibilidad a los fármacos (tabla 17) y sus combinaciones con ruxolitinib con su plataforma de citometría de flujo automatizada.

Fármacos	Concentraciones ( $\mu\text{M}$ )							
<i>Ruxolitinib</i>	10.00	3.33	1.11	0.37	0.12	0.041	0.0137	0.0046
<i>BKM120</i>	40.00	13.33	4.44	1.48	0.49	0.165	0.0549	0.0183
<i>AUY922</i>	40.00	10.00	2.50	0.63	0.16	0.039	0.0098	0.0024
<i>HSP990</i>	400.00	50.00	6.25	0.78	0.10	0.012	0.0015	0.0002
<i>Bortezomib</i>	3.10	0.31	0.16	0.12	0.01	0.006	0.0031	0.0003
<i>Ponatinib</i>	200.00	50.00	12.50	3.13	0.78	0.195	0.0488	0.0122
<i>Pomalidomida</i>	100.00	25.00	6.25	1.56	0.39	0.098	0.0244	0.0061
<i>Nilotinib</i>	100.00	28.57	8.16	2.33	0.67	0.190	0.0544	0.0155
<i>Midostaurin</i>	40.00	10.00	2.50	0.63	0.16	0.039	0.0098	0.0024
<i>MEK162</i>	40.00	10.00	2.50	0.63	0.16	0.039	0.0098	0.0024
<i>Everolimus</i>	200.00	66.67	22.22	7.41	2.47	0.823	0.2743	0.0914
<i>LDE225</i>	40.00	10.00	2.50	0.63	0.16	0.039	0.0098	0.0024
<i>LCL161</i>	40.00	10.00	2.50	0.63	0.16	0.039	0.0098	0.0024
<i>Panobinostat</i>	3.00	0.30	0.15	0.12	0.01	0.006	0.0030	0.0003
<i>BEZ235</i>	40.00	10.00	2.50	0.63	0.16	0.039	0.0098	0.0024
<i>Sorafenib</i>	100.00	28.57	8.16	2.33	0.67	0.190	0.0544	0.0155
<i>NSC 74859</i>	10.00	1.25	0.16	0.02	0.0024			
<i>Pimozide</i>	115.00	23.00	4.60	0.92	0.18			
<i>Bosutinib</i>	400.00	50.00	6.25	0.78	0.10			
<i>Perifosine</i>	50.00	6.25	0.78	0.10	0.01			
<i>Alfa Interferon (U)</i>	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00			
<i>SB 431542</i>	200.00	50.00	12.50	3.13	0.78			
<i>SP600125</i>	200.00	40.00	8.00	1.60	0.32			
<i>Marimastat</i>	400.00	50.00	6.25	0.78	0.10			
<i>Prednisolone</i>	120.00	10.00	1.00	0.10	0.0001			
<i>Anagrelide</i>	40.00	5.00	0.63	0.08	0.01			
<i>Danazol</i>	120.00	30.00	7.50	1.88	0.47			

Tabla 18. Concentraciones de los fármacos ensayados en Vivia Biotech.

Brevemente, las células se sembraron en RPMI 10% FBS a 15.000 células por pocillo en placas de 96 pocillos en presencia de los fármacos solos y en combinación con ruxolitinib, con DMSO como vehículo. La concentración máxima de DMSO en cultivo

fue 0.5%. Se realizaron curvas de 8 ó 5 puntos solos o en presencia de 100nM de ruxolitinib (tabla 18).

#### 4.2.- *Análisis de datos de curvas de inhibición y sinergias.*

El análisis de las curvas dosis respuesta a fármacos se llevó a cabo con el programa informático XL FIT (IDBS, Londres) empleando el modelo de regresión no lineal (ecuación 2)

[Ecuación 2]

$$Y = \frac{E_{\max} - E_0}{1 + \left[ \frac{EC_{50}}{X} \right]^{\gamma}}$$

Donde X es la concentración del fármaco,  $E_{\max}$  es la eficacia máxima del fármaco en términos de supervivencia,  $E_0$  es la supervivencia cuando sólo se aplica DMSO, el vehículo en el que disolvemos el fármaco,  $EC_{50}$  concentración de fármaco en la cual se consigue en 50 % de la acción total del fármaco y  $\gamma$  es la pendiente.

El análisis de sinergia se realizó con el programa Calcsyn v2.0 (Biosoft, Ferguson, MO, USA). Los cálculos realizados por el programa se basan en la ecuación del efecto medio (ecuación 3) (del inglés *median-effect equation*) formulada por Chou (74).

[Ecuación 3]

$$f_a/f_u = (D/D_m)^m$$

Donde  $f_a$  es la fracción afectada por la acción del fármaco;  $f_u$ , la fracción no afectada (del inglés, *fraction unaffected*); D es la dosis del fármaco;  $D_m$ , es la dosis en la que se consigue la mitad del efecto máximo provocado por dicho fármaco y m es el

parámetro que indica la forma de la ecuación. Para varios fármacos, la ecuación 3 pasa a ser (ecuación 4):

$$[\text{Ecuación 4}] \quad \left[ \frac{(f_a)_{1,2}}{(f_u)_{1,2}} \right]^{1/m} = \left[ \frac{(f_a)_1}{(f_u)_1} \right]^{1/m} + \left[ \frac{(f_a)_2}{(f_u)_2} \right]^{1/m} = \frac{(D)_1}{(D)_1} + \frac{(D)_2}{(D)_2}$$

El índice de combinación (del inglés, *CI*, *combination index*) es el parámetro por el cual cuantificamos la sinergia o antagonismo de dos drogas (ecuación 5).

$$[\text{Ecuación 5}] \quad CI = \frac{(D)_1}{(D)_1} + \frac{(D)_2}{(D)_2}$$

Donde  $D_x$  es la concentración de cada fármaco que provoca un efecto determinado. Cuando *CI* es menor de 1 indica sinergismo, cuando es igual a 1, indica aditividad y cuando es mayor que 1, antagonismo.

También se calculó el índice de reducción de dosis (*DRI*, del inglés, *dose reduction index*) (75) (ecuación 6):

$$[\text{Ecuación 6}] \quad DRI_1 = \frac{(D_x)_1}{(D)_1}$$

### **5.- Estudio del efecto de la combinación de fármacos elegida en la fase previa sobre la célula patológica**

#### **5.1.-Curvas dosis-respuesta en líneas celulares:**

Para determinar la sensibilidad a los fármacos (ruxolitinib, nilotinib y prednisolona) en líneas celulares, se sembraron 10.000 células por pocillo de placa de 96 pocillos en las líneas BA/F3 wt y BA/F3 JAK2 V617F en RPMI 10% FBS. En el caso de BA/F3 wt, se añadió también un 10% del medio condicionado WEHI-3B. En la línea celular SET2 se sembraron 20.000 células por pocillo en RPMI 20% FBS. Se emplearon concentraciones crecientes de los fármacos (tabla 19). Los fármacos se prepararon en DMSO con una concentración máxima en el cultivo de 0.2%. El volumen final fue de 100  $\mu$ L por pocillo.

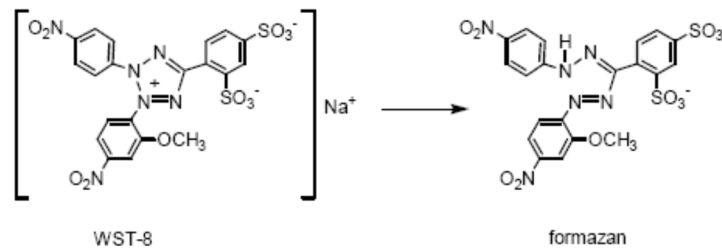
Fármaco	Concentraciones
Ruxolitinib	0.0064 – 20 $\mu$ M
Nilotinib	0.064 – 80 $\mu$ M
Prednisolona	0.032 – 100 $\mu$ M

**Tabla 19: Concentraciones de fármacos empleadas en las curvas dosis respuesta.**

Se procedió a la incubación de los cultivos durante 48h a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo, se añadieron 10  $\mu$ L de WST-8 (Cell Counting Kit - 8 BioChemika; Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos) para determinar viabilidad celular y se volvió a incubar entre 50 minutos y 1.5 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Después se realizó una lectura de absorbancias a 620 y 450 nm en lector de placas (*Epoch Microplate Spectrophotometer*, Biotek, Winooski, Vermont, EEUU). El porcentaje de viabilidad se calculó respecto al control con DMSO.

El WST-8 es una sal de tetrazolio que se reduce por las deshidrogenasas celulares para dar lugar a un formazán (figura 12), un compuesto de color amarillo con absorbancia a

450 nm. La cantidad de formazán producido es directamente proporcional a la cantidad de células vivas en el cultivo.



**Figura 12. Reducción del WST-8 a formazán.**

Se midió la absorbancia a 620 nm para restar la absorbancia debida a la dispersión de la luz al incidir sobre las células.

Para determinar el grado de sinergia entre los distintos fármacos, se sembraron las distintas líneas celulares en presencia de las combinaciones de fármacos detalladas en la tabla 20. A las 48 horas se procedió a determinar el porcentaje de viabilidad como en el caso de las curvas dosis respuesta.

## 5.2.- Curvas dosis-respuesta en pacientes:

Como se explicó en apartados anteriores, las células mononucleadas se extrajeron de 6-10 mL sangre periférica y se separaron por gradiente de densidad, centrifugando a 300 g durante 30 minutos sin freno de parada y a 4°C. Las células se lavaron con PBS y se centrifugaron a 250 g, 5 minutos. Seguidamente se realizó la lisis de eritrocitos con tampón EL (del inglés, Buffer EL, *erithrocyte lysis buffer*, Quiagen, Hilden, Germany): se incubó 10 minutos en una noria a temperatura ambiente y después se centrifugó a 250 g, 5 minutos. Seguidamente se volvió a lavar la muestra con PBS.



[Ruxolitinib] ( $\mu\text{M}$ )	[Nilotinib] ( $\mu\text{M}$ )	[Prednisolona] ( $\mu\text{M}$ )
0.0064	0.32	
0.0064	1.6	
0.032	0.32	
0.032	1.6	
0.032	8	
0.16	1.6	
0.16	8	
0.0064		0.16
0.0064		0.8
0.032		0.16
0.032		0.8
0.16		0.16
0.16		0.8
0.0064	0.32	0.16
0.0064	0.32	0.8
0.0064	1.6	0.16
0.0064	1.6	0.8
0.032	0.32	0.16
0.032	0.32	0.8
0.032	1.6	0.16
0.032	1.6	0.8
0.032	8	0.8
0.032	8	0.16
0.16	1.6	0.8
0.16	1.6	0.16
0.16	8	0.8
0.16	8	0.16

**Tabla 20: Concentraciones empleadas en las combinaciones de fármacos.**

El pellet celular se resuspendió en 1 mL de IMDM y se procedió al conteo de células viables con azul tripán. Se sembraron en metilcelulosa (suplementada con IL3 y SCF como se detalló más arriba) a una concentración celular final de  $0.2$  ó  $0.5 \times 10^6$  células/mL dependiendo de si las muestras procedían de pacientes o donantes sanos, respectivamente.

En este punto se añadieron los fármacos a cada cultivo como se indica en las tablas 19 y 20. Los fármacos se prepararon en DMSO y se llegó una concentración máxima de DMSO en cultivo de 0.2%.

Por último, se sembraron 400  $\mu\text{L}$  por pocillo en placas de 48 pocillos y se incubaron a 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  durante 12-15 días.

A las dos semanas, se miraron las células a la lupa invertida (Eclipse TS100, Nikon, Minato, Tokyo, Japan) para hacer una inspección cualitativa de las colonias obtenidas. Después se procedió a levantar las colonias resuspendiendo la metilcelulosa en PBS con 10% FBS, centrifugando a 300 g, 5 minutos.

Se realizó un marcaje celular con anticuerpos monoclonales anti CD45, CD13 y con anexina V (tabla 21) (Biolegend, San Diego, California, EEUU) en tampón para la unión de anexina V (ABB, del inglés, *Annexin Binding Buffer*; BD, Franklin Lakes, New Jersey, EEUU). Se incubó 20 minutos en oscuridad, se centrifugó y se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de ABB.

Diana/ molécula	Fluoróforo	Nombre completo	$\lambda_{\text{ex}}$ (nm)	$\lambda_{\text{em}}$ (nm)
CD45	APC/Cy7	Aloficocianina-Cy7	652	785
	APC-H7	Aloficocianina-H7		
CD13	APC	Aloficocianina	650	660
Anexina V	PE	Ficoeritrina	565	578

**Tabla 21: Anticuerpos para citometría de flujo conjugados con sus respectivos fluoróforos.** Longitud de onda de máxima excitación:  $\lambda_{\text{ex}}$ ; longitud de onda de máxima emisión:  $\lambda_{\text{em}}$ .

Para calcular el número de eventos por microlitro para normalizar todas las citometrías se utilizaron las microesferas *Perfect-Count Microspheres*<sup>TM</sup> (Cytognos, Santa Marta de Tormes, Salamanca, España). Antes de pasar cada muestra por el citómetro se añadieron al tubo 100  $\mu\text{L}$  de las microesferas. El cálculo que hay que realizar posteriormente se indica en la ecuación 7:

[Ecuación 7]

$$\text{Recuento absoluto (células}/\mu\text{L}) = \frac{\text{N}^{\circ} \text{ de células de la subpoblación}}{\text{Total de microesferas}} \text{N}^{\circ} \text{ microesferas}/\mu\text{L}$$

### 5.3.- *Análisis de datos de curvas de inhibición y sinergias.*

El análisis de las curvas dosis respuesta a fármacos se llevó a cabo con el programa informático GraphPadPrism 6.0 empleando el modelo de regresión no lineal (ecuación 8).

[Ecuación 8]

$$Y = E_0 \left( \frac{E_{max} - E_0}{1 + 10^{(\log EC_{50} - X)\gamma}} \right)$$

El análisis de sinergia se realizó con el programa Calcosyn como se explicó más arriba, calculando los parámetros CI y DRI.

Para el análisis estadístico se empleó el t-test y se tomó por significativos p-valores inferiores a 0.05. Cuando las poblaciones presentaron anomalías, se realizó el test de Wilcoxon y se tomó como significativo p-valores menores de 0.1.

#### 5.4.- Estudio de las vías de señalización afectadas por el tratamiento: arrays de proteínas

##### 5.4.1.- Arrays de proteínas:

Para hacer un rastreo de las rutas de señalización que se veían afectadas por los fármacos, se trataron las líneas celulares SET2 y BAF3 JAK2 V617F con las concentraciones de fármacos y sus combinaciones elegidos en el análisis de sinergia explicado previamente.

Para ello se empleó el Human Phospho-kinase Array (*Proteome Profiler* TM, R&D Systems, Mineápolis, Minesota, EEUU). Las proteínas estudiadas se detallan en la tabla 22.

Proteínas			
Akt1/2/3	FAK	MSK1/2	Src
AMPKa1	Fgr	p27	STAT2
AMPKa2	Fyn	p38a	STAT3
b-Catenin	GSK-3a/b	p53	Stat5a
Chk-2	Hck	p70 S6 kinase	STAT5a/b
c-Jun	HSP27	PDGF Rb	STAT5b
CREB	HSP60	PLC-gamma1	STAT6
EGF R	JNK 1/2/3	PRAS40	TOR
eNOS	Lck	PYK2	WNK1
ERK1/2	Lyn	RSK1/2/3	Yes

**Tabla 22: Proteínas estudiadas en el Human Phospho-Kinase Array kit (Proteome Profiler TM, R&D Systems).**

5.4.1.1.- *Recogida del extracto proteico:*

Se sembraron 10 mL de cada una de las líneas celulares a  $0.5 \times 10^6$  células/mL. Después de 3 horas se añadieron 10  $\mu$ L de cada fármaco o combinación de ellos, preparados previamente a una concentración 1000 veces superior a la deseada (tabla 23).

Fármaco	[Fármaco] Alícuota	[Fármaco] Cultivo
<b>Ruxolitinib</b>	0.032 mM	0.032 $\mu$ M
<b>Nilotinib</b>	1.6 mM	1.6 $\mu$ M
<b>Prednisolona</b>	0.8 mM	0.8 $\mu$ M
<b>Ruxolitinib Nilotinib</b>	0.032 mM 1.6 mM	0.032 $\mu$ M 1.6 $\mu$ M
<b>Ruxolitinib Nilotinib Prednisolona</b>	0.032 mM 1.6 mM 0.8 mM	0.032 $\mu$ M 1.6 $\mu$ M 0.8 $\mu$ M

**Tabla 23. Concentración de fármacos empleados en el estudio de rutas de señalización afectadas.**

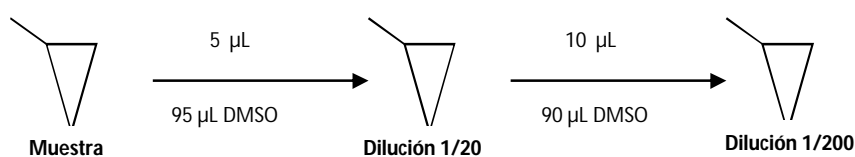
Después de 30 minutos o 24 horas, se recogió el cultivo y se lavó en 40 mL de PBS frío. Se centrifugó a 300g durante 5 minutos. El pellet se resuspendió en 1 mL de PBS frío y se volvió a centrifugar. Se añadió 1 mL del tampón de lisis correspondiente provisto en el kit (añadimos inhibidores de proteasas y fosfatasa (Roche, Basilea, Suiza)), de manera que por cada mililitro de tampón de lisis hubiera 10 millones de células. Se incubó en hielo y se agitó 30 segundos cada 10 minutos durante 30 minutos. Después de este tiempo se centrifugó a 14.000 g durante 5 minutos. El sobrenadante se guardó a -20°C.

#### 5.4.1.2.- Determinación de la cantidad de proteína

Se determinó mediante la técnica del BCA (Pierce, ThermoFisher Scientific) según indica la casa comercial.

La técnica del BCA se basa en la reacción de Biuret de reducción del catión  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+}$  en medio alcalino por las proteínas, combinado con la detección colorimétrica del catión cuproso  $\text{Cu}^{+}$  gracias al ácido bicinconínico (BCA). Se forman complejos de dos moléculas de BCA con un ión cuproso. Este complejo es de color morado con un máximo de absorbancia a 562 nm.

Se realizó una recta patrón de albúmina de suero bovino (BSA, *bovine serum albumin*) con concentraciones de 200-0.5  $\mu\text{g/mL}$ . Se hizo una dilución 1:1 con la solución de trabajo, una mezcla de 50 partes de la solución A, 48 de la solución B y 2 de la C. En el caso de las muestras, se hicieron diluciones seriadas hasta llegar a una dilución 1/200 de la muestra original (Figura 13). 100  $\mu\text{L}$  de esta dilución (1/200) se mezcló con la solución de trabajo a partes iguales.



**Figura 13. Diluciones de las muestras para la determinación de proteínas por el método de BCA.**

El formato empleado fue el de placa de 96 pocillos. Se incubó durante 2 horas a 37°C. Después se realizó la lectura de la absorbancia en el lector de placas a una longitud de onda de 562nm. Para determinar la concentración de proteína en cada muestra, se

interpoló en la recta patrón, se restó la absorbancia del tampón de lisis y se multiplicó por el factor de dilución.

#### 5.4.1.3.- Array de fosfoproteínas:

Brevemente, después de bloquear las membranas de nitrocelulosa con el tampón 1 durante 1 hora a temperatura ambiente y en agitación, se añadieron los extractos proteicos preparados con el tampón 2/3 del kit hasta conseguir una concentración entre 200 y 600 µg de proteína. Se incubó durante toda la noche a 4°C y en agitación. A la mañana siguiente se realizaron 3 lavados de 10 minutos de duración con el tampón de lavado proporcionado en el kit. Después se incubó con el coctel de anticuerpos a 4°C durante toda la noche y en agitación. Se volvieron a realizar los lavados. El siguiente paso fue la incubación con estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano picante (en inglés, *horseradish-peroxidase*: HRP), durante 30 minutos, a temperatura ambiente y en agitación. Después de los lavados correspondientes, se reveló el *array* con la mezcla 1:1 del *Chemi reagent 1* y 2 (peróxido de hidrógeno y luminol respectivamente). La captura de la imagen se realizó con el analizador de imágenes ChemiDoc MP (Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, Estados Unidos).

#### 5.4.1.3.- Análisis de las imágenes

Se analizaron las imágenes obtenidas con el programa ImageLab versión 5.1 (BioRad laboratories).

#### 5.4.2.- Western Blot de vías de señalización afectadas:

Para confirmar los resultados obtenidos de los *arrays*, se realizó un western blot.

##### 5.4.2.1.- Recogida del extracto proteico

La recogida del extracto proteico fue prácticamente igual a la realizada para el experimento de los *arrays* de fosfoproteínas. En este caso fue necesario menos cantidad de proteína y sembramos 5 mL de cultivo a  $0.5 \times 10^6$  células/mL. Después de 3 horas de incubación se añadieron 5  $\mu$ L de los fármacos o su combinación y después de otros 30 minutos o 3 horas, se realizaron los lavados con PBS frío y se lisó con el tampón de lisis (150 mM NaCl, 1.0% Tritón X-100, 0.5% deoxicolato sódico, 0.1% dodecil sulfato sódico (SDS, del inglés, *sodium dodecyl sulfate*) 50 mM Tris, pH 8.0, (Todo adquirido en Sigma-Aldrich) más inhibidores de proteasas y fosfatasas). Se añadieron 250  $\mu$ L del tampón de lisis al pellet celular, para conseguir una proporción de  $4 \times 10^6$  células por mililitro de tampón.

##### 5.4.2.2.- Determinación de la cantidad de proteína:

Se realizó un BCA de la misma manera que se explicó en el apartado de los *arrays* de proteínas.

##### 5.4.2.3.- Electroforesis:

Se utilizó el sistema electroforético de BioRad. Las muestras se separaron en función de su peso molecular debido a la presencia de  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma-Aldrich) que reduce los puentes disulfuro y SDS, un detergente aniónico que despliega las proteínas y las confiere carga negativa proporcional a su tamaño.



Se emplearon geles de poliacrilamida/bisacrilamida al 10%:

Gel separador: 10% acrilamida/bisacrilamida (37,5:1) (Bio-Rad), 375 mM Tris HCl pH 8.8, 0.1% (w/v) SDS, 0.08% (w/v) persulfato amónico (Sigma-Aldrich), 0.005%(v/v) TEMED (Sigma-Aldrich).

Gel concentrante: 5% acrilamida/bisacrilamida (37,5:1), 125 mM Tris HCl pH 6,5, 0.1% (w/v) SDS, 0.067% (w/v) persulfato amónico, 0.083%(v/v) TEMED.

Se prepararon las muestras con tampón de carga (*Laemmli sample buffer 4x*, Bio-Rad). Este tampón contiene glicina, lo que confiere mayor densidad a la muestra y facilita la carga de la misma en el gel. También contiene azul de bromofenol, lo que permite seguir el frente de electroforesis. A 180 µL de extracto proteico se añadieron 60 µL de tampón de carga 4x. Cargamos 20 µg de proteína en cada carril.

El tampón de electroforesis empleado fue: 25 mM Tris, 192 mM glicina y 0.1% SDS, pH 8.3. Las condiciones de electroforesis utilizadas fueron 70V constantes hasta que el frente se concentrara y 100V hasta el final de la electroforesis.

#### 5.4.2.4.- Transferencia:

Se llevó a cabo en el sistema de BioRad. La transferencia de proteínas se realizó desde un gel de electroforesis hasta una membrana de nitrocelulosa (Amersham GE Healthcare, Buckinghamshire Inglaterra) con un tamaño de poro de 45 µm. El tampón de electroforesis empleado fue: 25 mM Tris, 192 mM glicina, 0.01% SDS y 10% metanol. Las condiciones de electrotransferencia fueron 30 V constantes durante 4hr.

## 5.4.2.5.- Inmunodetección:

Al término de la transferencia, se bloqueó la membrana de nitrocelulosa en tampón tris salino (TBS, del inglés *Tris buffer saline*) con 0.1% Tween-20 (Sigma-Aldrich) (TBS-T) al 3% de BSA, durante 1 hora a temperatura ambiente o durante toda la noche a 4°C, en cualquier caso, en agitación.

Seguidamente se realizó la incubación con el anticuerpo primario (tabla 24). En TBS-T con BSA al 0.3%, durante toda la noche a 4°C en agitación.

<b>Nombre del antígeno</b>	<b>Residuo fosforilado</b>	<b>Conejo / Ratón</b>	<b>Dilución No Fosfo</b>	<b>Dilución Fosfo</b>	<b>Casa comercial</b>
<b>JAK2</b>	Y1007/1008	Conejo	1:1000	1:1000	Cell Signaling
<b>STAT 5</b>	Y694	Conejo	1:1000	1:1000	Cell Signaling
<b>AKT</b>	T308	Conejo	1:1000	1:1000	Cell Signaling
<b>ERK 1/2</b>	T202/T204	Conejo	1:1000	1:1000	Cell Signaling
<b>SRC</b>	Y416	Conejo	1:1000	1:1000	Cell Signaling
<b>Tubulina</b>		Ratón	1:1000	1:1000	Cell Signaling

**Tabla 24. Anticuerpos primarios utilizados en el western blot.**

Para eliminar todo el anticuerpo sobrante, se realizaron 3 lavados de 5 minutos con TBS-T, y luego se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario, que, según el caso, fue anti-conejo (dilución 1:5000) o anti-ratón (dilución 1:20.000) (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, Estados Unidos). La incubación fue de una hora a temperatura ambiente, en agitación. Antes de proceder al revelado con ELC Plus (Amersham GE Healthcare), se llevaron a cabo 5 lavados de 5 minutos cada uno con TBS-T, en agitación.

La captura de imagen se llevó a cabo con el analizador de imágenes ChemiDoc MP.

#### *5.4.3.- Análisis estadístico:*

El análisis estadístico se realizó con el GraphPadPrism 6.0. Se Realizó la prueba t-Student para datos emparejados cuando las poblaciones eran normales y la prueba no paramétrica T de Wilcoxon cuando no.

### **6.- Estudio de la capacidad de inhibición del tratamiento elegido de la síntesis de colágeno en células estromales de la médula ósea:**

Para el estudio de la capacidad de inhibición de la síntesis de colágeno por parte del tratamiento elegido en fases previas, empleamos dos técnicas diferentes, una para ver cambios a nivel proteico (inmunocitoquímica, ICQ) y otro, para ver cambios en la expresión del ARNm (PCR cuantitativa (qPCR)).

#### **6.1.- qPCR:**

##### *6.1.1- Preparación del cultivo:*

Esta vez se emplearon frascos de 25 cm<sup>2</sup> para la siembra, para asegurarse de recoger el suficiente ARNm. Como antes, se sembraron 5000 células/cm<sup>2</sup>. O lo que es lo mismo, 5 mL a 25000 células/mL. Se incubaron 2-3 días antes de proceder al cambio de medio sin suero.

Después de 24 h se procedió al tratamiento de los distintos pocillos con los fármacos. Después de este tiempo, se estimuló la síntesis de colágeno mediante los factores de crecimiento TGF- $\beta$  durante 24 horas.

Después se lavó el cultivo con PBS atemperado. Se añadió 0.5 mL de tripsina y se dejó incubar a 37°C durante aproximadamente 5 minutos. Se recogió el cultivo con 10 mL de DMEM 10% FBS, para inactivar la tripsina. Se centrifugó a 300g durante 5 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lisó con tampón RLT Plus (RNeasy Lysis Buffer Plus; Qiagen, Hilden, Alemania) con 1%  $\beta$ -mercaptoetanol (Sigma Aldrich). Las muestras se guardaron a -80°C.

#### 6.1.2.- Extracción de ARNm:

La extracción de ARNm se hizo con el kit AllPrep™ DNA/RNA Micro kit (Qiagen) y se siguieron las instrucciones del fabricante. Brevemente, se pasó el extracto celular en RLT más 1%  $\beta$ -mercaptoetanol por una columna (*Allprep DNA Mini Spin Columns*), en la que se quedó retenido el ADN. El eluido de la columna fue lo que contenía el ARN. Se mezcló con etanol al 70% en una dilución 1:1, para luego pasarlo por a siguiente columna (*RNeasy® MinElute® Spin columns*). El ARN se quedó retenido en esta columna. Ahora se procedió a lavar la columna con distintos tampones suministrados en el kit (RW1 y RPE). El último lavado se realizó con etanol al 80%. En este paso era muy importante dejar la columna seca, por lo que se realizaron 2 centrifugaciones a máxima revolución. Después se añadieron 14  $\mu$ L de agua de grado biología molecular, libre de RNasas, también aportado por el kit. Se centrifugó a máxima revolución y en el eluido quedó el ARN del extracto celular inicial. Se guardó a -80°C.

#### 6.1.3.- RT-PCR:

Se realizó la retrotranscripción del ARNm a ADN complementario (ADNc) mediante la reacción en cadena de la polimerasa en transcripción reversa (en inglés, *reverse transcription polymerase chain reaction*, RT-PCR). Gracias a la transcriptasa inversa, que usa como molde ARNm, y a una mezcla de cebadores generados al azar, se logró pasar todo el ARNm del extracto celular a ADNc.

La mezcla de reacción se encuentra detallada en la tabla 25. Todos los reactivos son de Life Technologies (Thermo Fisher Scientific). Y el programa en la tabla 26. La retrotranscripción se llevó a cabo en un termociclador Veriti 96 well Thermal cycler.

Reactivos	Volumen (μl/muestra)
Buffer	1
dNTPs	0.4
Primer Pool	1
Multiscribe	0.5
RNAse Inh	0.5
Volumen RNA	6 μL
<b>Vfinal retro</b>	<b>9.4 μl</b>

Tabla 25: Mezcla de reacción de la retrotranscripción.

Paso	Tiempo	Temperatura
Activación de la enzima	10min	25°C
Retrotranscripción	120min	37°C
Desactivación de la enzima	5min	85°C

Tabla 26. Programa de la retrotranscripción.

#### 6.1.4.- Q-PCR:

Para analizar la diferencia de expresión de colágeno I (COL1A1) de los distintos tratamientos, se realizó una PCR cuantitativa. La q-PCR pretende la cuantificación absoluta o, como en este caso, relativa, de la cantidad de ADN de una muestra dada. Se basa en la existencia de sondas que presentan un fluoróforo y un *quencher*, que hibridan específicamente en el ADNc de nuestro gen de interés. De manera que cuando la polimerasa, al ir transcribiendo y amplificando las cadenas de ADNc, van

degradando las sondas y separando el fluoróforo de su *quencher*. Así la fluorescencia del fluoróforo ya no será absorbida por el *quencher* y será detectada por el detector del termociclador.

Para hacer la cuantificación relativa, se empleó el gen control gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (en inglés: *glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*, GAPDH).

Para realizar la qPCR, se diluyeron 10 veces los productos de reacción de la retrotranscripción con agua. La mezcla de reacción se detalla en la tabla 27 y el programa en la tabla 28. Se usó el termociclador 7900HT Fast Real-Time PCR Systems.

Reactivos	Volumen (μl/muestra)
Taqman assay 20X (sonda+cebadores)	0.5
Taqman gene expression 2X (polimerasa)	5
Agua (ultraspec, DEPC)	2.5
cDNA (1:10)	2

Tabla 27: Mezcla de reacción de la qPCR. Todos los reactivos se adquirieron en Life Technologies.

Paso	Tiempo	Temperatura
Activación de la enzima	2 min	50 °C
Activación de la enzima	10 min	95 °C
Desnaturalización	15 s	95°C
Alineamiento / Elongación	1 min	60 °C

Tabla 28. Programa de la qPCR

El análisis de la expresión se realizó según la propuesta de Pfaffl (2001) (76), en el que el ratio de expresión entre dos muestras es (ecuación 9):

[Ecuación 9]

$$\text{Ratio} = \frac{(E_n)^{\Delta CP_D(\text{control-muestra})}}{(E_R)^{\Delta CP_R(\text{control-muestra})}}$$

Donde E es la eficiencia de la PCR, D es el gen diana, R el gen control y CP viene del inglés *crossing point* (punto de corte).

## **6.2.- Inmunocitoquímica**

### **6.2.1.- Preparación del cultivo**

Antes de proceder a la siembra, se colocaron cubres de cristal de 10 mm de diámetro (VWR, Radnor, Pensilvania, estados Unidos) dentro de los pocillos de placas de 48 pocillos. Luego se procedió a su esterilización exponiéndolos a la luz ultravioleta durante al menos 4 horas.

Se sembraron 5000 células/cm<sup>2</sup>. Los pocillos de placas de 48 tienen un área de 0.75 cm<sup>2</sup>, por lo que se sembraron 0.5 mL a 7500 células/mL por pocillo.

A las 72 horas se procedió a cambiar el medio DMEM 10% FBS por DMEM sin suero, para dejar a las células en un estado basal y asegurarse de que el efecto observado sobre la expresión de colágeno era debido a los factores de crecimiento y fármacos añadidos posteriormente y no por los factores de crecimiento que pudiera tener el FBS.

Después de 24h se trataron los distintos pocillos con los fármacos durante 1 hora. Después de este tiempo, se procedió a la estimulación de la síntesis de colágeno con TGFβ durante 24h.

### 6.2.2.- Inmunocitoquímica:

Antes de proceder a la fijación del cultivo, se lavaron 3 veces los pocillos con PBS. La fijación se hizo con paraformaldehído (PFA) al 4% (Merck Millipore, Billerica, Massachusetts, EEUU), en PBS con un pH de 7.4, durante 15 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo, se retiró el PFA y se procedió a lavar el cultivo 2 veces con PBS para eliminar los restos.

Para permeabilizar y bloquear, se incubó con 0.25% Tritón x-100 en PBS más 1% BSA durante 30 minutos.

Posteriormente se incubó con el anticuerpo primario (anti-colágeno I; Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, UK), durante 1 hr a temperatura ambiente, con una dilución 1:500 en 1% BSA-PBST. Después se lavó 3 veces con PBS.

Para desactivar la peroxidasa interna, se incubó con 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PBS durante 5 minutos. Muy importante eliminar los restos de agua oxigenada antes de proceder al siguiente paso. Por eso se lavaron 3 veces con PBS.

Ahora se procedió a la incubación con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con HRP. Se preparó en 1% BSA-PBST con una dilución 1:2000. La incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente.

Después se lavó con PBS y se incubó con diaminobencidina (DAB) (DAB substrate kit, Abcam, Cambridge, United Kingdom) para que, al ser oxidada por la HRP, apareciera un color marrón en las células que expresen colágeno I. Brevemente, se preparó la solución de trabajo, 30 µL de cromógeno en 1.5 mL de sustrato, y se incubó durante 2 minutos, o hasta que empezase a precipitar. Se paró la reacción añadiendo PBS.

Para teñir los núcleos se empleó hematoxilina (Solución de dematoxilina de Carazzi, AppliChem Panreac, Darmstadt, Alemania). La incubación fue de 10 minutos y posterior lavado con agua hasta que dejó de desteñir.



Pasando el cultivo por etanol (AppliChem Panreac) de 96° y después de 100° y por último por xilol (AppliChem Panreac), se consiguió deshidratar el cultivo para proceder al montaje de la muestra con DPX (Sigma Aldrich).

Finalmente se analizaron los distintos cultivos con sus tratamientos respectivos con el microscopio Eclipse 80i (Nikon) y se tomaron imágenes con la cámara DS-Fi1 (Nikon).

#### *6.2.3.- Análisis estadístico*

El análisis estadístico se realizó con el GraphPadPrism 6.0. Se Realizó la prueba t-Student para datos emparejados cuando las poblaciones eran normales y la prueba no paramétrica T de Wilcoxon cuando no.

### **7.- Estudio de resistencias adquiridas al tratamiento:**

Para el estudio de resistencias adquiridas debido a la exposición prolongada y concentraciones altas de fármacos, se decidió generar líneas celulares resistentes a ruxolitinib, nilotinib y sus combinaciones. La combinación de ruxolitinib y nilotinib se decidió realizarla en presencia o en ausencia de prednisolona.

Para ello se mantuvieron los cultivos de BA/F3 JAK2 V617F y BA/F3 wt en presencia de concentraciones crecientes de ruxolitinib y nilotinib solos o en combinación durante un mes. Las concentraciones iniciales y finales se detallan en la tabla 29.

Fármaco	Concentración Inicial	Concentración Final
Ruxolitinib	20 nM	1 $\mu$ M
Nilotinib	2 $\mu$ M	16 $\mu$ M
Prednisolona	20 nM	1 $\mu$ M

**Tabla 29.** Concentraciones de fármacos empleadas para la generación de líneas resistentes.

Para la comprobación de la generación de resistencia se realizaron curvas dosis respuesta a ruxolitinib y nilotinib.



# RESULTADOS



## RESULTADOS

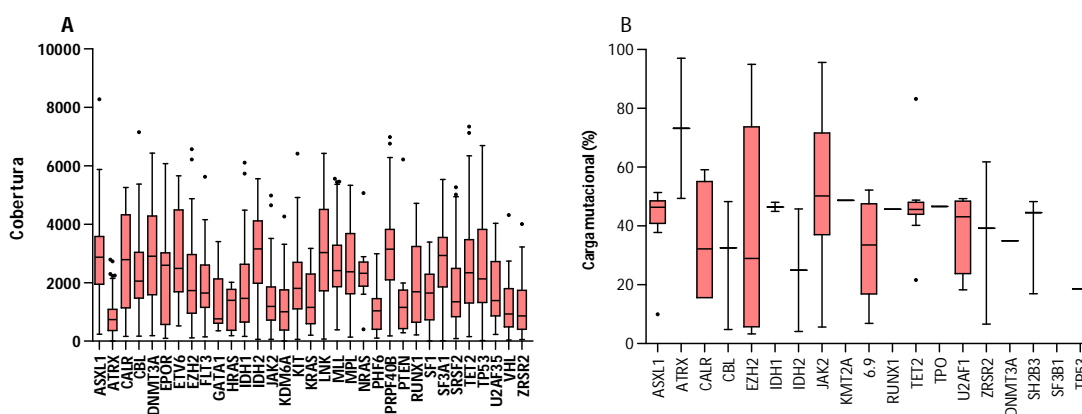
### 1.- Caracterización de los pacientes con MF mediante NGS.

En este apartado se muestran los resultados de la secuenciación por NGS de la serie de pacientes que fueron secuenciados en el Hospital 12 de Octubre dentro de un proyecto conjunto con el Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca.

Como se introdujo en material y métodos, los pacientes escogidos para la caracterización de las mutaciones en MF fueron aquellos que cumplían los criterios diagnósticos para MF propuestos por la OMS de 2016 (3), además de aquellos de los que se dispusiera muestra de ADN procedente del Biobanco.

#### 1.1.- Información metodológica

Se realizó la secuenciación de 36 genes (ver tabla 17) en 27 pacientes de MF. Las medianas de profundidad de secuenciación de cada gen rondaron entre las 736 lecturas en el caso de ATRX hasta 3152 lecturas en IDH2, con una cobertura mínima de 14 lecturas y una máxima de 8271 (Figura 14a). La media de la uniformidad fue del  $81 \pm 7\%$ . Además la carga mutacional de las variantes encontradas por gen varió desde un 3% hasta un 100% (Figura 14b).



**Figura 14: A) Cobertura de los genes secuenciados en las 27 muestras analizadas teniendo en cuenta todos los amplicones de cada gen. B) Carga mutacional de las variantes encontradas en cada gen.**

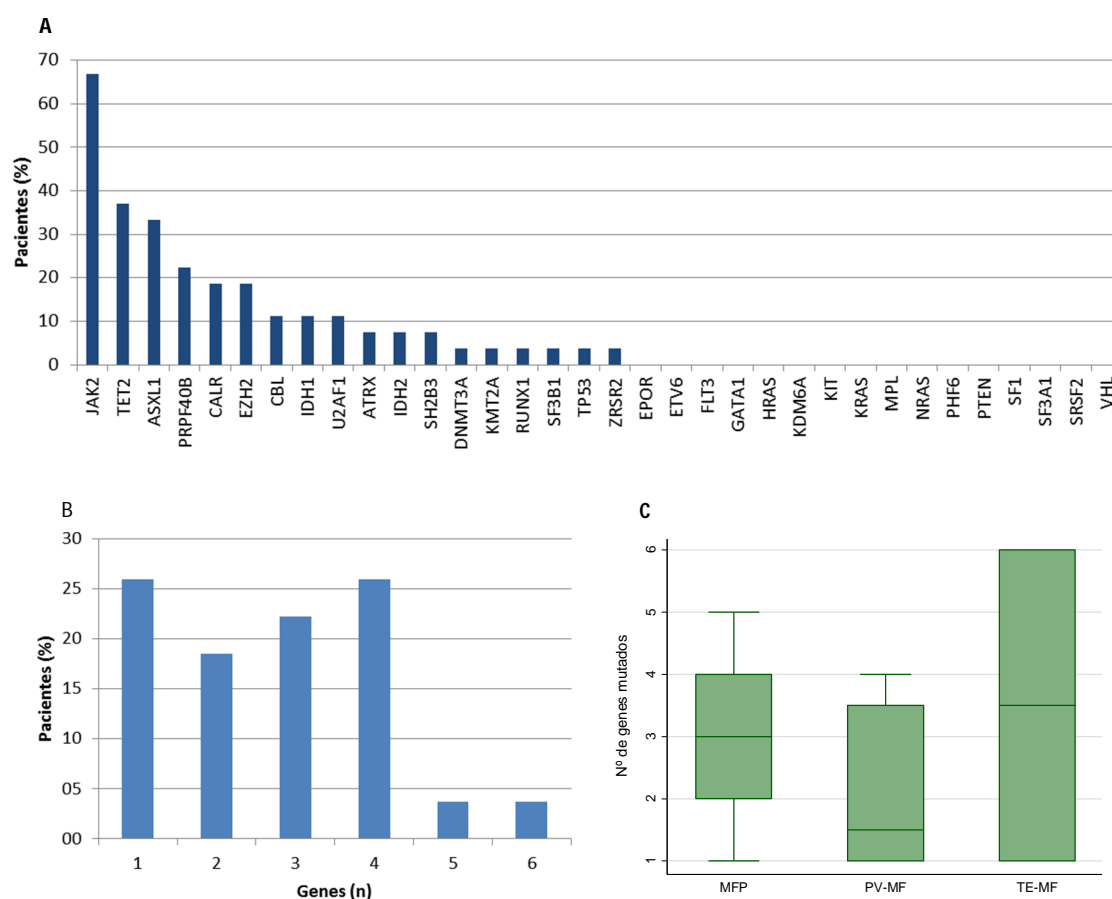
### 1.2.- Comparación de la secuenciación de muestras de sangre periférica con muestras de médula ósea.

Para comprobar si se podía usar indistintamente muestras de ADN proveniente de médula ósea o sangre periférica, se secuenciaron muestras de ambas procedencias extraídas con una diferencia de menos de 6 meses de 4 pacientes diferentes. Se encontró que las variantes en ambos tipos de muestras eran las mismas y con un porcentaje muy similar (Tabla 30). Sólo hubo una discrepancia en el paciente número 1, en el que se detectó una variante de KDM6A en un porcentaje de 10.8% en médula ósea. Por lo que es probable que las mutaciones en bajo porcentaje no puedan ser detectadas en sangre periférica.

Código Paciente	Tipo muestra	% variante	Gen	Tránsito	Secuencia aa	Secuencia DNA
P01	sp	49.6	KMT2A	NM_001197104.1	p.Ser2295Asn	c.6884G>A
P01	mo	48.7	KMT2A	NM_001197104.1	p.Ser2295Asn	c.6884G>A
P01	sp	39.0	TET2	NM_001127208.2	p.Gln1030Ter	c.3088C>T
P01	mo	44.9	TET2	NM_001127208.2	p.Gln1030Ter	c.3088C>T
P01	sp	42.0	TET2	NM_001127208.2	p.Trp1847Ter	c.5541G>A
P01	mo	47.1	TET2	NM_001127208.2	p.Trp1847Ter	c.5541G>A
P01	sp	48.1	JAK2	NM_004972.3	p.Val617Phe	c.1849G>T
P01	mo	50.2	JAK2	NM_004972.3	p.Val617Phe	c.1849G>T
P01	mo	10.8	KDM6A	NM_021140.2	p.Pro1007Ala	c.3019C>G
P04	sp	34.3	CALR	NM_004343.3	p.Glu372fs	c.1118_1148del
P04	mo	32.2	CALR	NM_004343.3	p.Glu372fs	c.1118_1148del
P04	sp	40.6	TET2	NM_001127208.2	p.Asn275fs	c.822_822delC
P04	mo	45.9	TET2	NM_001127208.2	p.Asn275fs	c.822_822delC
P21	sp	84.3	JAK2	NM_004972.3	p.Val617Phe	c.1849G>T
P21	mo	88.8	JAK2	NM_004972.3	p.Val617Phe	c.1849G>T
P23	sp	40.9	ETV6	NM_001987.4	p.Gln57fs	c.165_166insTTGCA
P23	mo	45.2	ETV6	NM_001987.4	p.Gln57fs	c.165_166insTTGCA
P23	sp	47.1	ASXL1	NM_015338.5	p.Gln428fs	c.1281_1282insT
P23	mo	49.1	ASXL1	NM_015338.5	p.Gln428fs	c.1281_1282insT

**Tabla 30. Comparación de las variantes detectadas y sus porcentajes en muestras de sangre periférica y médula ósea. Sp: sangre periférica; mo: médula ósea; aa: aminoácido.**

### 1.3.- Descripción de las mutaciones



**Figura 15: Porcentaje de pacientes que presentan mutaciones en cada gen (a).** Porcentaje de pacientes agrupados por el número de genes mutados (b). Frecuencias de genes mutados agrupados por tipo de diagnóstico (c).

El gen que presentó una mayor frecuencia de mutación fue JAK2, en un 66.7% de los pacientes. En todos los casos la mutación fue V617F. Los siguientes genes en frecuencia de variantes fueron TET2 (37.0%), ASXL1 (33.3 %), PRPF40B (22.2%), EZH2 (18.5 %) y CALR (18.5 %). 28 genes se encontraron mutados en menos de un 15% de los pacientes, de los cuales en 16 no se encontró ninguna mutación en ninguno de los pacientes (figura 15a). En 5 pacientes se encontraron más de una mutación en el mismo gen, concretamente ocurrió en TET2 (n = 3), ASXL1 (n = 1) y EZH2 (n = 1).



	MFP																PV-MF																TE-MF		Genes	Variantes
N Pac																																				
JAK2																																			18	18
CALR																																			5	5
TET2																																			10	14
ASXL1																																			9	10
PRPF40B																																			6	6
EZH2																																			5	6
CBL																																			3	3
IDH1																																			3	3
U2AF1																																			3	3
ATRX																																			2	2
IDH2																																			2	2
SH2B3																																			2	2
DNMT3A																																			1	1
KMT2A																																			1	1
RUNX1																																			1	1
SF3B1																																			1	1
TP53																																			1	1
ZRSR2																																			1	1
N gen mut	5	4	4	4	3	3	3	2	2	1	1	4	3	2	4	2	4	3	2	1	1	1	4	1	6	1	74	80								
N var	5	4	5	6	3	4	3	3	2	2	1	4	3	2	5	2	4	3	2	1	1	1	4	1	7	1										

116

#### 1.4.- Correlación con la clínica: Estudio de factores diagnósticos y pronósticos en función de:

##### 1.4.1.- Tipo de diagnóstico

Se decidió comparar el grupo de MFP (n = 15) frente a las MF secundarias a PV (n = 6) y TE (n = 2). Las características de los pacientes se detallan en la tabla 31: el conjunto de pacientes presentaba una edad de 66.25 (58.70-78.04) años y una proporción del 60.87% (39.13%) de varones. No se encontraron diferencias significativas entre subgrupos.

Parámetro (N=23)		N=23	MFP (n=15)	PV-MF (n=6)	TE-MF (n=2)
Edad al Diagnóstico (años)	Mediana (IQR)	66.25 (58.70-78.04)	65.0 (60.0-77.0)	60.7 (52.3-80.1)	72.1 (70.8-73.3)
Dx					
MFP	% (n)	65.22 (15)			
PV-MF	% (n)	26.09 (6)			
TE-MF	% (n)	8.7 (2)			
Hb (g/L)	Mediana (IQR)	10.0 (9.0-12.4)	9.6 (9.0-13.0)	11.6 (11.0-12.4)	8.6 (8.1-9.0)
Pla ( /mm <sup>3</sup> )	Mediana (IQR)	195 (120-463)	298 (150-545)	136 (108 -190)	228 (120-335)
Sexo, M (F)	%	60.87 (39.13)	66.67 (33.33)	50.00 (50.00)	50.00 (50.00)
Esplenomegalia, sí(no)	%	86.96 (13.04)	86.67 (13.33)	87.5 (12.5)	87.5 (12.5)
Biop MO					
MF-0	% (n)	4.35 (1)	6.67 (1)	0 (0)	0 (0)
MF-1	% (n)	82.61(19)	80 (12)	100.0 (6)	50.0 (1)
MF-2	% (n)	4.35 (1)	0 (0)	0 (0)	50.0 (1)
MF-3	% (n)	8.7(2)	13.33 (2)	0 (0)	0 (0)

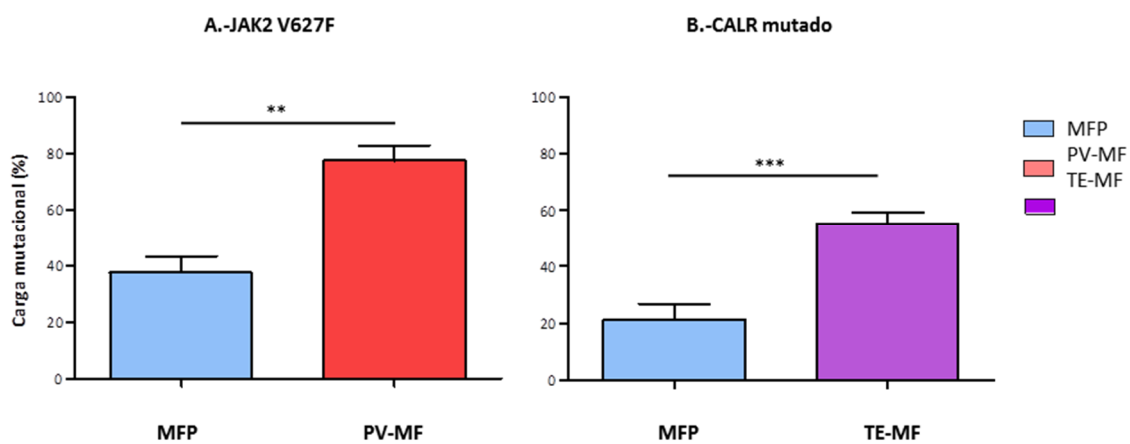
Tabla 31. Parámetros clínicos y demográficos desglosados por diagnóstico. IQR: rango intercuartil.

##### 1.4.2.- Carga mutacional de JAK2 o CALR

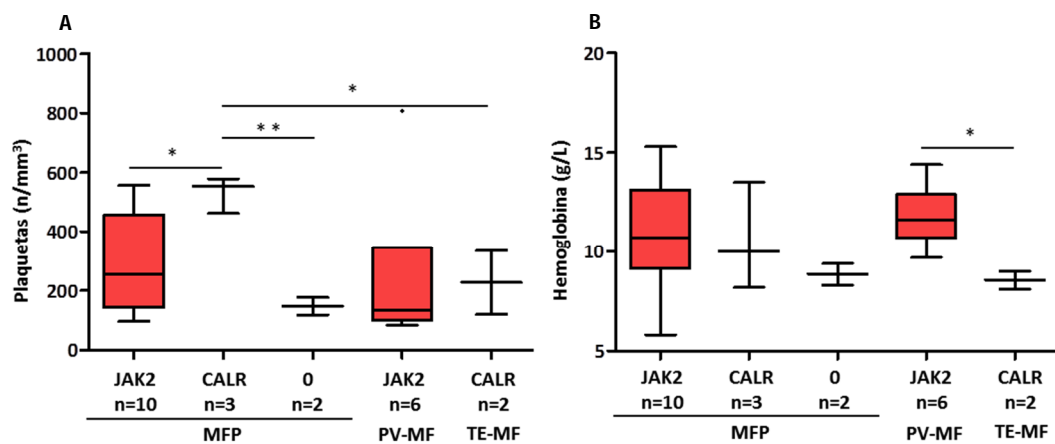
Se decidió estudiar la carga mutacional de JAK2 y CALR por grupos diagnósticos y se encontró que la carga mutacional de JAK2 V617F en pacientes con PV-MF (media =

$77.5 \pm 5.3 \%$  ( $n = 7$ ) es del doble que en pacientes con MFP (media =  $37.4 \pm 5.8\%$ ) ( $n = 12$ ) ( $p$ -valor = 0.001)(figura 17a).

En el caso de las mutaciones en CALR, independientemente del tipo, la carga mutacional de los pacientes con MFP tenían una media de  $21.1 \pm 5.5 \%$  ( $n = 3$ ) mientras que los pacientes con TE-MF su media era  $55.2 \pm 4.1 \%$  ( $n = 2$ ) ( $p$ -valor < 0.0001) (Figura 17b).



**Figura 17: Carga mutacional (media y error estándar) de JAK2 y CALR por tipo de diagnóstico:** (a) carga mutacional de JAK2 V617F en mielofibrosis primaria (MFP) frente a mielofibrosis secundaria a policitemia vera (PV-MF). (b) carga mutacional de CALR mutado en MFP frente a mielofibrosis secundaria a trombocitemia esencial (TE-MF). \*\*:  $p$ -valor < 0.01; \*\*\*:  $p$ -valor < 0.001



**Figura 18: Número de plaquetas (a) y cantidad de hemoglobina (b) al diagnóstico agrupados por diagnóstico y presencia de mutación en JAK2 o CALR.** \*:  $p$ -valor < 0.05; \*\*:  $p$ -valor < 0.01.

El grupo de pacientes que tuvo un mayor número de plaquetas al diagnóstico con respecto al resto de grupos fue el de pacientes con MFP y CALR mutado (554 (463-579)/mm<sup>3</sup>): se encontraron diferencias significativas cuando se compararon con los pacientes con MFP y la mutación JAK2 V617F (254.5 (143.0-458.0)/mm<sup>3</sup> ; p-valor = 0.0410 ) y con los doble negativo (148.5  $\pm$  21.5 /mm<sup>3</sup> ; p-valor = 0.0047); también hubo diferencias significativas con los pacientes de TE-MF (227.5  $\pm$  107.5/mm<sup>3</sup>) (p-valor = 0.0219) (Figura 18a).

Se pudo observar una diferencia de cantidad de Hb en pacientes PV-MF, todos con la mutación JAK2 V617F, (11.6 (10.7-12.9)g/L) frente a pacientes con TE-MF, todos con CALR (8.5  $\pm$  0.5g/L) (p-valor = 0.0500); pero no con los pacientes de MFP con CALR mutado (Figura 18b).

#### 1.4.3.- Presencia de mutaciones o no en genes relacionados con la regulación epigenética (TET2, ASXL1, EZH2 e IDH1/2)

Parámetro		Sin mutación en ASXL1, EZH2, IDH1 y IDH2 (n = 7)	$\geq 1$ mutación en ASXL1, EZH2, IDH1 y IDH2 (n = 16)	p-valor
Sexo, M (F)	%	42.9 (57.1)	68.8 (31.3)	0.363
Edad al Diagnóstico (años)	Mediana (IQR)	58.7 (52.4-71.9)	68.4 (62.4-78.3)	0.213
Dx				0.044
MFP	% (n)	28.6(2)	81.3 (13)	
PV-MF	% (n)	57.1 (4)	12.5 (2)	0.017
TE-MF	% (n)	14.3 (1)	6.3 (1)	0.262
Hb (g/L)	Mediana (IQR)	11.4 (9.5-12.4)	9.7 (9.0-12.5)	0.589
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	Mediana (IQR)	150(108-335)	254(138-504)	0.479
Esplenomegalia, si(no)	%	85.7 (14.3)	87.5 (12.5)	1.000
Biop MO				0.143
MF-0	% (n)	14.3(1)	0.0(0)	
MF-1	% (n)	71.4(5)	87.5(14)	
MF-2	% (n)	14.3(1)	0.0(0)	
MF-3	% (n)	0.0(0)	12.5(2)	

Tabla 32. Estratificación de los pacientes por presencia de al menos una mutación en TET2, ASXL1, EZH2, IDH1 o IDH2. IQR: rango intercuartil.

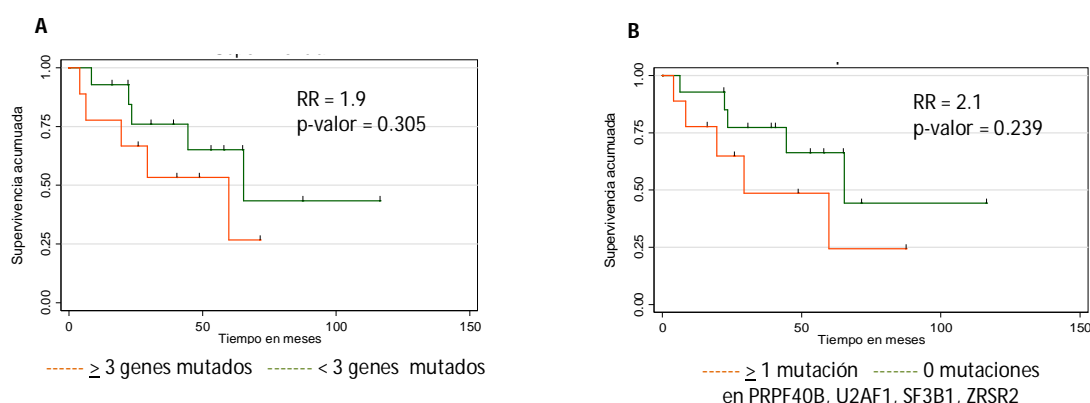
Se decidió agrupar los genes relacionados con la regulación epigenética en una sola variable y estudiar su asociación con las variables clínicas. Se observó que los pacientes con al menos una mutación en TET2, ASXL1, EZH2 o IDH1/2 fueron diagnosticados preferentemente de MFP (p-valor = 0.057) (Tabla 32). Además, este grupo de pacientes tendían a presentar mayor grado de fibrosis (p-valor = 0.079).

#### 1.4.4.- Presencia de mutaciones en genes relacionados con el splicing.

Al estudiar el impacto de mutaciones en la clínica de los pacientes con MF, se encontró que aquellos pacientes con al menos una mutación en PRPF40B, U2AF1, SF3B1, ZRSR2 presentaban una menor cantidad de Hb en sangre periférica al diagnóstico (9.0 (9.0-12.4) g/L) frente a los que no (11.6 (9.7-13.0) g/L) (p-valor = 0.049) (tabla 33). Y una tendencia a presentar una disminución de la supervivencia global con un RR de 2.1 (p-valor = 0.239) (figura 19).

Parámetro		Sin mutación en PRPF40B, U2AF1, SF3B1, ZRSR2 (n = 14)	≥ 1 mutación en PRPF40B, U2AF1, SF3B1, ZRSR2 (n=9)	p-valor
Sexo, M (F)	%	42.9 (57.1)	88.9 (11.1)	0.040
Edad al Diagnóstico (años)	Mediana (IQR)	66.1 (58.7-79.0)	70.5 (60.8-73.3)	0.987
Dx				0.121
MFP	% (n)	64.3 (9)	66.67 (6)	
PV-MF	% (n)	35.7 (5)	11.1 (1)	
TE-MF	% (n)	0 (0)	22.2 (2)	
Hb (g/L)	Mediana (IQR)	11.6 (9.7-13.0)	9.0 (8.3-9.6)	0.049
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	Mediana (IQR)	172 (118-463)	298 (178.0-347)	0.526
Esplenomegalia, si(no)	%	92.9 (7.1)	77.8 (22.2)	0.538
Biop MO				0.352
MF-0	% (n)	7.1 (1)	0 (0)	
MF-1	% (n)	78.6 (11)	88.9 (8)	
MF-2	% (n)	0 (0)	11.1 (1)	
MF-3	% (n)	14.3 (2)	0 (0)	

Tabla 33. Estratificación de los pacientes por presencia de al menos una mutación en PRPF40B, U2AF1, SF3B1, ZRSR2. IQR: rango intercuartil.



**Figura 19.** Representación de Kaplan-meier de los tiempos de supervivencia libre de transformación leucémica de los pacientes estratificados por el número de mutaciones (a) o por la presencia de al menos una mutación en PRPF40B, U2AF1, SF3B1, ZRSR2 (b).

#### 1.4.5.- Presencia de hasta 3 o más genes mutados

Se estudió si había relación entre el número de genes mutados y los diferentes parámetros clínicos registrados. Se encontró que los pacientes con más de tres genes mutados presentaban una menor cantidad de Hb en sangre periférica, con una mediana de 10.0 (9.0-12.4) g/L, frente a aquellos que presentaban menos de 3 mutaciones (11.6 (9.0-9.7) g/L) siendo esta diferencia casi significativa ( $p = 0.052$ ). Cuando se comparó la supervivencia entre los dos grupos, se observó que aquellos que presentan más de 3 mutaciones tendían a tener una menor supervivencia global con un RR de 1.929 (95% CI: 0.556-6.698; p-valor = 0.305) frente a los que tenían hasta 3 mutaciones (tabla 34; figura 19).

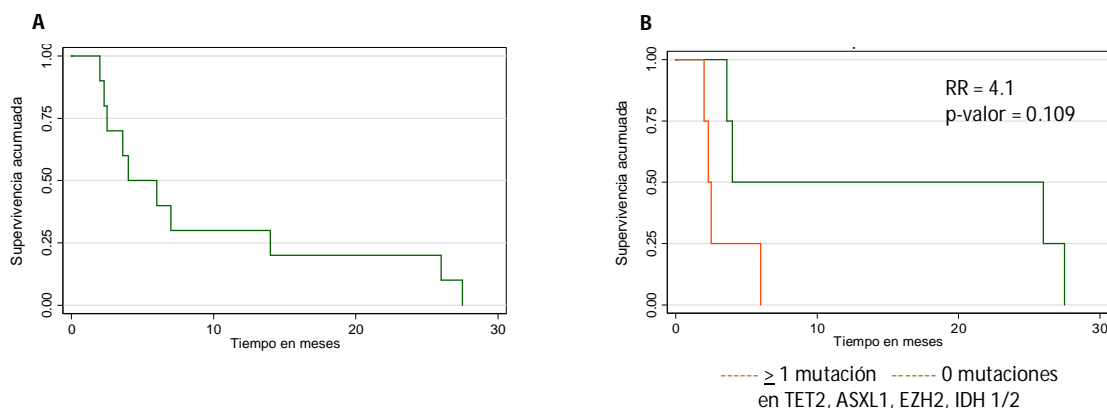
Parámetro		≤ 3 genes mutados (n = 14)	> 3 genes mutados (n = 9)	p-valor
Sexo, M (F)	%	57.4 (8)	42.7 (6)	1
Edad al Diagnóstico (años)	Mediana (IQR)	63.7 (55.15-73.6)	70.5 (66.0-78.0)	0.285
Dx				0.458
MFP	% (n)	57.1 (8)	77.8 (7)	
PV-MF	% (n)	35.7 (5)	11.1 (1)	
TE-MF	% (n)	7.14 (1)	11.1 (1)	
Hb (g/L)	Mediana (IQR)	11.6 (9.0-9.7)	10.0 (9.0-12.4)	0.052
Plaquetas (/mm <sup>3</sup> )	Mediana (IQR)	184 (153-545)	211 (120-463)	0.712
Esplenomegalia, si(no)	%	85.7 (14.29)	88.9 (11.1)	1
Biop MO				
MF-0	% (n)	7.1 (1)	0.0 (0)	Ref.
MF-1	% (n)	78.6 (11)	88.9 (8)	0.442
MF-2	% (n)	7.1 (1)	0.0 (0)	0.84
MF-3	% (n)	7.1 (1)	11.1 (1)	0.442

**Tabla 34. Estratificación de los pacientes por el número de mutaciones.** IQR: rango intercuartil.

### 1.5.- Respuesta clínica a ruxolitinib

Se estudiaron 10 pacientes con MF (3 TE-MF, 3 PV-MF y 4 MFP) que fueron tratados con ruxolitinib (tabla 34). De esos 10 pacientes, 7 alcanzaron una mejoría clínica gracias al tratamiento. 6 de ellos consiguieron respuesta esplénica: 4 pacientes consiguieron una reducción total del bazo hasta hacerse no palpable, 1 alcanzó una reducción mayor del 50% en relación al tamaño basal antes del tratamiento. Uno de los pacientes no obtuvo ninguna respuesta esplénica y otro no fue valorable porque no presentó esplenomegalia inicial. Los 7 pacientes consiguieron una mejoría de sus síntomas constitucionales, mientras que sólo 3 consiguieron un estado de independencia transfusional. 5 de los 7 pacientes consiguieron una respuesta de duración mayor a 6 meses y, de esos 5, 3 tuvieron una respuesta mayor de 12 meses (figura 20a). Los pacientes con al menos una mutación en TET2, ASXL1, EZH2 o IDH1/2, presentaron unos tiempos de duración de respuesta a ruxolitinib menores de 6 meses. En definitiva, se encontró una tendencia a la disminución del tiempo en el que el

paciente se encontraba en respuesta a ruxolitinib, con un RR de 4.1 (p-valor = 0.109) (figura 20b).



**Figura 20.** Representación de Kaplan-meier de los tiempos de duración de la respuesta a ruxolitinib de los pacientes de MF sin estratificación (a) y estratificado según si presentaban al menos una mutación en TET2, ASXL1, EZH2 o IDH1/2 (b).

## **2.- Estudio de la sensibilidad ex vivo de muestras de pacientes de MF a ruxolitinib**

### **2.1.- Descripción de los resultados obtenidos con los diferentes modelos ex vivo**

#### **2.1.1.- Modelo directo**

Con este modelo lo que se pretendió fue una mínima manipulación de la muestra, manteniendo el nicho de las células madre hematopoyéticas en sangre periférica. Se estudió la sensibilidad a ruxolitinib en muestras de 6 pacientes después de 72 horas. De todas las curvas con actividad, se observó una eficacia máxima con una supervivencia por debajo del 40% (la mediana de  $E_{\max}$  en términos de supervivencia fue de 31.8 (0.0-38.8) %) y una  $EC_{50}$  con una mediana de 0.835 (0.157-2.091)  $\mu$ M. En uno de los casos no se obtuvo respuesta a ruxolitinib ( $E_{\max}$  = 87.6 (SEM = 0.9) %) (tabla 35, figura 21).



Código	Dx	Género	Edad Dx	Jak2 V617F (Si/No)	CALR mut. (Si/no)	Mut. Epigen. (n)	Trat. Ruxo	Edad Inicio trat.	Línea de trat	Epo	Tipo resp.	Reducción esplénica	Independencia transfusional	Síntomas constitucionales	Duración resp. (meses)	Modelo	Tratamiento
P05	TE-MF	M	70	No	Si	No	Si	75	2	Si	CI	100%	No	Si	26.0	Directo/Clásico	Ruxolitinib
P24	MFP	F	58	Si	No	No	Si	58	2	No	CI	100%	Si	Si	3.6	Amplif./ Directo/Clásico	Ruxolitinib + BKM120
P25	MFP	M	82	Si	Si	--	Si	84	2	Si	CI	100%	Si	No	14.0	Amplif./ Directo	Hydrea / Ruxolitinib
P09	PV-MF	F	49	Si	No	No	Si	49	2	No	CI	No	No	Si	4.0	Amplif.	Hydrea
P03	TE-MF	M	73	No	Si	Si	Si	73	1	No	NR	100%	No	Si	2.3	Amplif./ Directo/Clásico	Sin tratamiento
P02	PV-MF	M	83	Si	No	Si	Si	83	1	No	NR	100%	Si	Si	2.0	Amplif.	Ruxolitinib
P26	TE-MF	M	72	No	Si	--	Si	72	2	Si	CI	100%	No	Si	7.0	Directo/Clásico	Ruxolitinib/ Ruxolitinib
P08	PV-MF	F	80	Si	No	No	Si	80	1	Si	CI	> 50%	No	Si	27.5	Amplif./ Directo/Clásico	Ruxolitinib
P14	MFP	M	62	Si	No	Si	Si	65	3	Si	NR	> 50%	Si	Si	2.5	Clásico	Danazol
P16	MFP	F	78	Si	No	Si	Si	83	2	Si	CI	*	Si	Si	6.0	Clásico	Hydrea

**Tabla 34. Datos clínicos de los pacientes cuyas muestras fueron empleadas para el estudio de sensibilidad a ruxolitinib** en tres modelos diferentes de cultivo *ex vivo*: modelo clásico, directo o modelo de amplificación de células mieloides en metilcelulosa. Consideramos respuesta cuando la duración de la misma es de al menos 3 meses. M: masculino, F: femenino. Mut Epigen: mutación en al menos uno de los genes relacionados con la regulación epigenética (TET2, ASXL1, EZH2, IDH1/2). --: sin datos; \*: sin esplenomegalia inicial.

### 2.1.2.- Modelo clásico

Con este modelo se siguió con la tendencia de la mayoría de los artículos que estudian curvas de viabilidad en NMPc: se sembró y se trató simultáneamente las mononucleadas de sangre periférica en metilcelulosa. En este caso la actividad del ruxolitinib fue bastante mayor que en el modelo anterior, con una  $E_{\max}$  basada en el porcentaje de supervivencia con una mediana de 9.3 (1.9-21.7) % y una  $EC_{50}$  de 0.043 (0.023-0.140)  $\mu$ M (tabla 35, figura 21).

### 2.1.3.- Modelo de amplificación

Lo que se pretendió con este modelo fue aumentar el número de células, puesto que en algunos casos y para los modelos anteriores, la cantidad de células mononucleadas o  $CD34^+$  fue insuficiente. Durante el cultivo en metilcelulosa las células  $CD34^+$  se diferenciaron, por lo que el estudio se realizó en células mieloides  $CD13^+$ . Con este modelo *ex vivo* el ruxolitinib tuvo una  $E_{\max}$  de 54.3 (39.8-67.2) % y una  $EC_{50}$  de 0.747 (0.054-5.852)  $\mu$ M (tabla 35, figura 21).

	$E_{\max}$ (% SUPERVIV.)	$IC_{50}$ ( $\mu$ M)	ABC
<b>MODELO CLÁSICO</b>	9.3 (1.9-20.7)	0.043 (0.023-0.140)	256.6 (237.6-323.0)
<b>MODELO DIRECTO</b>	31.8 (0.0-38.8)	0.835 (0.157-2.091)	412.3 (368.0-478.5)
<b>MODELO DE AMPLIFICACIÓN</b>	54.3 (39.8-67.2)	0.747 (0.054-5.852)	446.2 (430.2-484.6)

**Tabla 35.** Parámetros obtenidos de las curvas dosis-respuesta a ruxolitinib realizadas con los diferentes modelos *ex vivo*. Mediana (rango intercuartil).

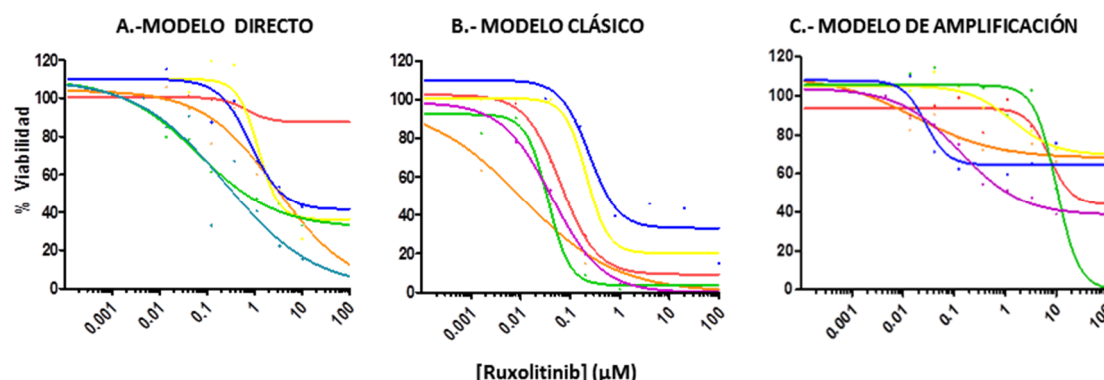


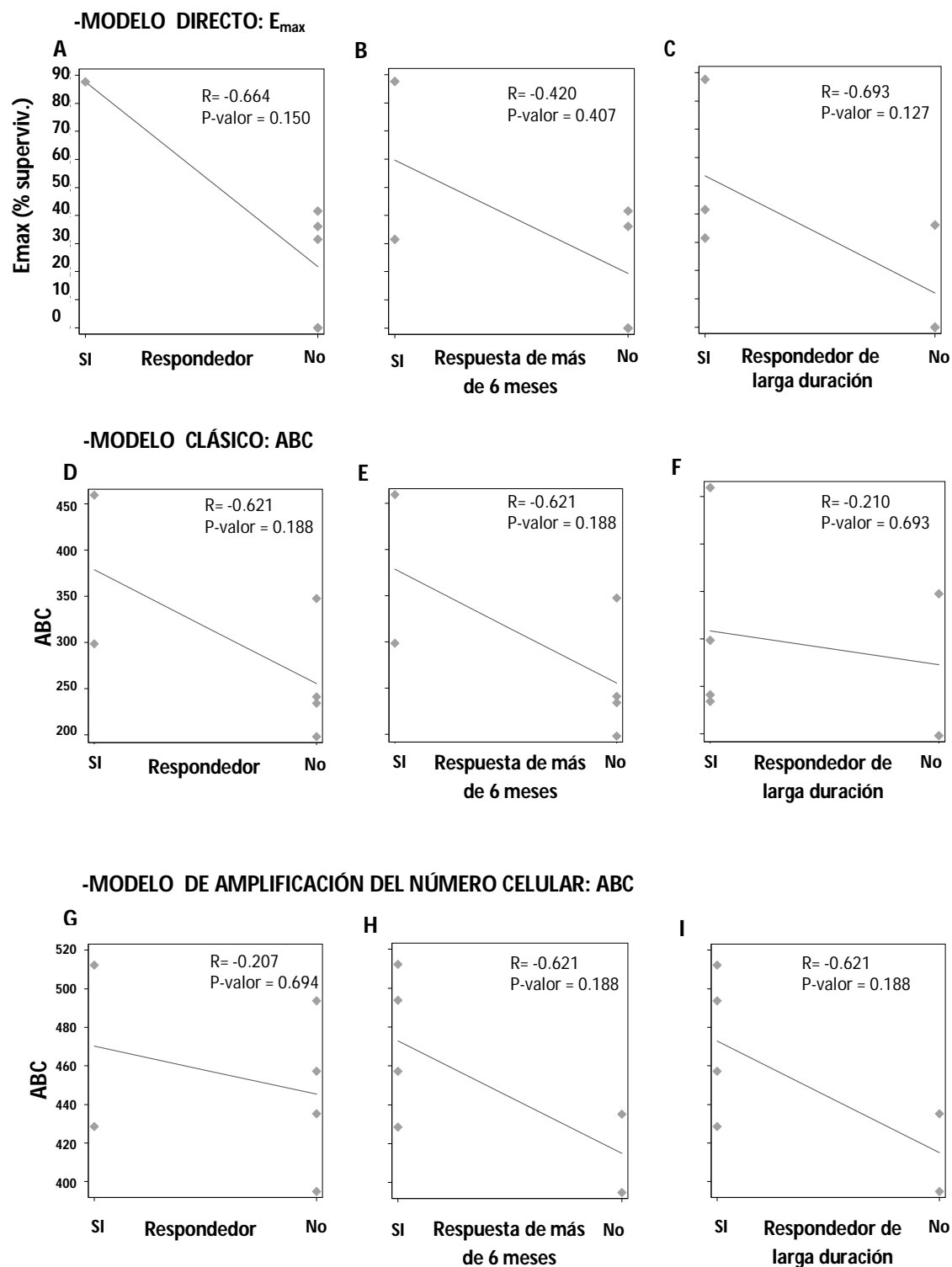
Figura 21. Curvas dosis respuesta de las muestras de pacientes procesadas con los modelos directo (a), clásico (b) o de amplificación (c).

#### 2.1.4.- Comparación de los modelos y correlación con la clínica

Como se puede observar en la tabla 35, el modelo en el que el ruxolitinib tuvo más efecto fue en el modelo clásico, con una mediana en supervivencia mínima de 9.3 (1.9-20.7) % y una  $EC_{50}$  de 0.043 (0.023-0.140)  $\mu$ M, lo que se refleja en un ABC de más de un 50% menos que en el resto de los modelos.

La ABC es una manera de integrar la información que ofrece tanto la  $E_{max}$  como la  $EC_{50}$ , la eficacia como la potencia del fármaco. Se puede ver como en los modelos directo y de amplificación, ambos parámetros se compensan dando un ABC muy similar, incluso cuando presentan discrepancias en sus  $E_{max}$  y  $EC_{50}$  (tabla 35).

Lo que se pretendió con esta comparación de modelos *ex vivo* era tener una herramienta que predijera la respuesta al tratamiento de los pacientes. El parámetro que se escogió para comparar fue la duración de la respuesta a ruxolitinib, puesto que engloba tanto la respuesta hematológica, esplénica y sintomática y duración de la misma.



**Figura 22: Correlación entre pacientes respondedores o no a ruxolitinib (a, d, g) con la  $E_{\max}$  del modelo directo y la ABC de los modelos clásico y de amplificación.** Se considera paciente respondedor cuando la respuesta al tratamiento es mayor a los 3 meses. Correlación con la duración de la respuesta en pacientes respondedores: respuesta mayor de 6 meses (b, e, h) o mayor de 24 meses (respondedores de larga duración) (c, f, i) con la  $E_{\max}$  del modelo directo y la ABC de los modelos clásico y de amplificación.

Se hicieron 3 clasificaciones de los pacientes de acuerdo con la duración de la respuesta a tratamiento: respuesta mayor de 3 meses (respondedores), mayor de 6 meses y mayor de 24 meses (respondedores de larga duración). Los modelos *ex vivo* con los que se discernió mejor si un paciente será respondedor o no al tratamiento fueron el directo ( $R = -0.664$ ;  $p\text{-valor} = 0.150$ ) y el clásico ( $R = -0.621$ ;  $p\text{-valor} = 0.188$ ). Mientras que los respondedores de larga duración se detectaron mejor con el modelo directo ( $R = -0.693$ ;  $p\text{-valor} = 0.127$ ) y con el de amplificación de células mieloides ( $R = -0.621$ ;  $p\text{-valor} = 0.188$ ) (figura 22).

### **3.- Búsqueda de la mejor terapia combinada con Ruxolitinib**

El objetivo fundamental de esta tesis es la búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib para el tratamiento de la MF. El principal problema que se nos planteó fue la obtención de suficientes células para hacer el cribado de los 28 fármacos, solos y en combinación con ruxolitinib.

Entre los modelos que mejor correlacionan con la respuesta clínica a ruxolitinib, el modelo directo y el de amplificación de células mieloides, se eligió el modelo de amplificación para realizar el cribado de fármacos, puesto que es el que genera la cantidad de células suficientes para el mismo. Como ya se ha descrito con anterioridad, en este modelo de cultivo *ex vivo*, las células mononucleadas de sangre periférica se sembraron en metilcelulosa suplementada con IL3 y SCF para facilitar el crecimiento de colonias mieloides. Después de dos semanas, las células mieloides obtenidas se pasaron a cultivo líquido y, en presencia de los fármacos y sus combinaciones, se realizaron las curvas dosis respuesta y análisis de sinergia. El análisis de la supervivencia celular se realizó por citometría de flujo.

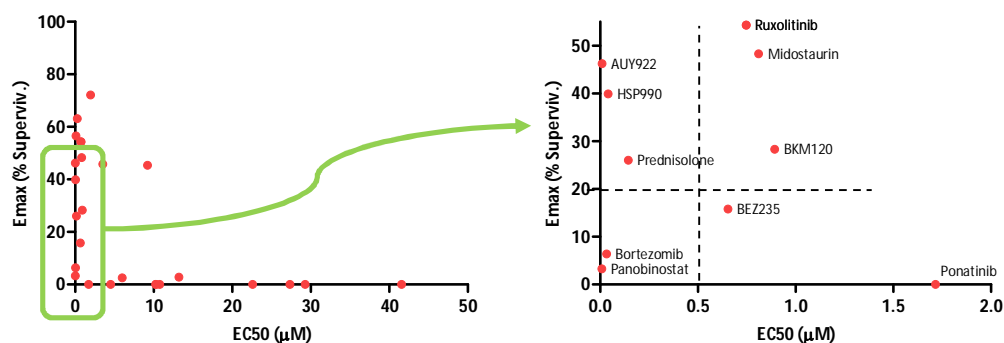
### 3.1.- Actividad de los fármacos en solitario

#### 3.1.1.- Pacientes

La actividad del ruxolitinib en este modelo no fue muy alta, con una mediana  $EC_{50}$  de 0.747 (0.054-5.852)  $\mu$ M de  $E_{max}$  de 54.3 (39.8-67.2) %. En un primer momento se pensó que podría ser debido a la diferencia del estatus mutacional de cada paciente, o incluso a si estaban o no recibiendo tratamiento con inhibidores de tirosquinasa, pero como se muestra en la tabla 36, vemos que no había una relación causa efecto entre presencia de mutación en JAK2 o tratamiento con actividad del ruxolitinib en la muestra.

	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)	$E_{max}$ (%)	JAK2 V617F	Tratamiento
P25	0,0	68,1	Si	Hydrea
P02	0,0	64,6	Si	Ruxolitinib
P08	0,1	38,4	Si	Ruxolitinib
P09	1,4	69,7	Si	Hydrea
P24	7,3	44,0	Si	R+B
P03	10,3	0,0	No	--

**Tabla 36: Valores de  $EC_{50}$  y  $E_{max}$  de curvas dosis respuesta a ruxolitinib** en muestras de pacientes de MF empleando el modelo de cultivo *ex vivo* basado en la amplificación de células mieloides en metilcelulosa.



**Figura 23. A) Representación de la mediana de  $EC_{50}$  enfrentada con la mediana de la  $E_{max}$  de los diferentes fármacos testados en solitario en muestras de pacientes. B) Representación con los fármacos más activos.**

En cuanto al resto de fármacos (tabla 37, figura 23), se pudo ver que los más activos fueron el panobinostat (inhibidor de HDAC) y bortezomib (inhibidor del proteasoma), con medianas de  $EC_{50}$  por debajo de 50 nM y  $E_{max}$  con supervivencias menores del 10%. Luego los fármacos AUY922 y HSP990 (inhibidores de la chaperona HSP90), la prednisolona, el principio activo de la prednisona, muy utilizado en la práctica clínica para controlar los síntomas de la enfermedad y el inhibidor de la proteína de señalización MEK, con una  $EC_{50}$  menores del 150 nM, pero con una eficiencia máxima en términos de supervivencia entre el 25% y el 60%.

Fármaco	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)			$E_{max}$ (% Superviv.)		
	Mediana	Q1	Q3	Mediana	Q1	Q3
Panobinostat	0,008	0,002	0,024	3,3	0,0	7,5
Bortezomib	0,033	0,002	0,056	6,4	1,9	11,0
Prednisolona	0,144	0,079	0,286	26,0	24,6	28,6
AUY922	0,009	0,003	0,018	46,2	22,5	46,8
HSP990	0,041	0,029	0,048	39,9	16,6	43,7
MEK162	0,109	0,054	1,354	56,5	55,2	62,4
Marimastat	0,250	0,250	0,250	63,1	63,1	63,1
BEZ235	0,654	0,152	1,138	15,8	10,0	19,5
Ruxolitinib	0,747	0,054	5,852	54,3	39,8	67,2
Midostaurin	0,811	0,502	2,207	48,3	35,7	53,6
BKM120	0,893	0,866	0,964	28,3	25,8	34,4
Ponatinib	1,716	1,317	3,341	0,0	0,0	0,0
Pomalidomide	1,961	1,961	1,961	72,1	72,1	72,1
Anagrelide	3,518	2,528	6,787	45,8	38,3	51,7
Bosutinib	4,517	2,674	9,740	0,0	0,0	0,0
Nilotinib	5,996	4,804	9,651	2,5	0,0	10,3
Danazol	9,220	8,026	10,414	45,4	39,6	51,3
Sorafenib	10,272	10,164	10,897	0,0	0,0	0,3
SP600125	10,272	10,164	10,897	0,0	0,0	0,3
Pimozide	10,767	9,189	12,767	0,0	0,0	0,0
Perifosine	13,208	12,626	13,789	2,8	1,4	4,2
Everolimus	22,606	17,676	25,872	0,0	0,0	0,0
SB431542	27,334	16,362	38,307	0,0	0,0	0,0
LCL161	29,289	14,791	36,337	0,0	0,0	8,9
NSC74859	41,576	41,576	41,576	0,0	0,0	0,0
Alfa INF	170,889	0,166	381,170	100,0	96,7	100,0

Tabla 37.  $E_{max}$  y  $EC_{50}$  de los diferentes fármacos testados en solitario en muestras de pacientes. Marcamos con rojo los fármacos más activos atendiendo tanto a su  $EC_{50}$ , como a su actividad máxima.

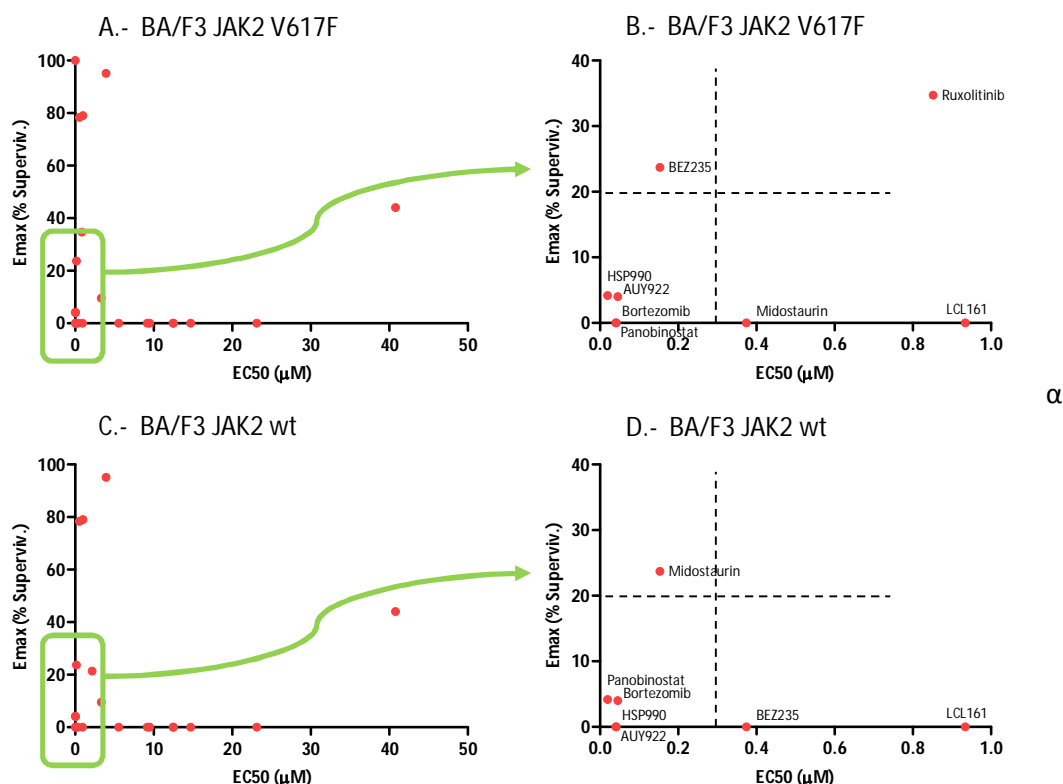
### 3.1.2.- Líneas celulares: BA/F3 wt y BA/F3 JAK2 V617F

Los fármacos más activos en las líneas celulares fueron prácticamente los mismos que en pacientes, aunque con algunas variaciones (tabla 38, figura 24). Los inhibidores de la chaperona HSP90 se encontraron en todos los casos dentro del grupo de fármacos más activos con  $EC_{50}$  por debajo de los 100 nM y actividades máximas cercanas al 0% de supervivencia. El inhibidor del proteasoma, bortezomib, tuvo, en ambas líneas celulares, una  $EC_{50}$  en torno a 40 nM, un poco menos activo que en el caso de pacientes.

BA/F3 JAK2 V617F					BA/F3 wt				
Fármaco	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)		$E_{max}$ (% Superviv.)		Fármaco	$EC_{50}$ ( $\mu$ M)		$E_{max}$ (% Superviv.)	
	Media	SD	Media	SD		Media	SD	Media	SD
AUY922	0,019	0,004	4,2	5,9	Bortezomib	0,038	0,020	0,0	0,0
Panobinostat	0,041	0,001	0,0	0,0	AUY922	0,046	0,013	8,2	11,6
Bortezomib	0,041	0,001	0,0	0,0	HSP990	0,090	0,033	2,0	2,1
HSP990	0,045	0,008	4,0	5,2	Panobinostat	0,266	0,230	0,0	0,0
BEZ235	0,153	0,154	23,7	8,1	Midostaurin	0,680	0,293	0,0	0,0
Midostaurin	0,374	0,026	0,0	0,0	BEZ235	0,898	1,234	28,5	8,3
Ruxolitinib	0,852	0,056	34,7	14,6	LCL161	1,257	0,149	0,0	0,0
Pomalidomide	0,536		78,4		Ruxolitinib	2,164	2,554	21,4	9,9
LCL161	0,934	0,952	0,0	0,0	BKM120	4,264	0,786	15,6	12,2
MEK162	0,980		79,0		Ponatinib	6,841	3,176	0,0	0,0
BKM120	3,331	1,409	9,5	13,4	Perifosine	15,891		0,0	
Alfa INF	3,917		95,1		Bosutinib	16,266	6,871	0,0	0,0
Ponatinib	5,530	0,860	0,0	0,0	Sorafenib	16,603	0,212	0,0	0,0
Bosutinib	9,192	4,190	0,0	0,0	SP600125	16,603	0,212	0,0	0,0
Pimozide	9,498		0,0		Pimozide	17,361	10,934	0,0	0,0
Sorafenib	12,473	1,201	0,0	0,0	Everolimus	35,113	20,728	0,0	0,0
SP600125	12,473	1,201	0,0	0,0	Danazol	64,501	7,455	0,0	0,0
Perifosine	14,718	4,170	0,0	0,0	SB431542	112,375	3,587	0,0	0,0
Everolimus	23,131	9,058	0,0	0,0	Marimastat	164,135		0,0	
Nilotinib	40,779	8,733	44,0	41,9	Pomalidomida	0,235		72,9	
Anagrelide	86,927		0,0		Nilotinib	25,619		100,0	
SB431542	94,353	17,511	0,0	0,0					
Prednisolona	0,000		100,0						

Tabla 38.  $E_{max}$  y  $EC_{50}$  de los diferentes fármacos testados en solitario las líneas celulares BA/F3 JAK2 V617F y BA/F3 wt. Marcamos con rojo los fármacos más activos atendiendo tanto a su  $EC_{50}$ , como a su actividad máxima.





**Figura 24. Representación de la mediana de  $EC_{50}$  enfrentada con la mediana de la  $E_{max}$  de los diferentes fármacos testados en solitario en las líneas celulares BA/F3 JAK2 V617F (a) y BA/F3 wt (c). Representación con los fármacos más activos en BA/F3 JAK2 V617F (b) y BA/F3 wt (d).**

El panobinostat, aunque se encontró entre los fármacos más activos tanto en BA/F3 JAK2 V617F como en la forma *wild type*, en esta última fue mucho menos activo, con una  $EC_{50}$  de  $266 \pm 230$  nM, mientras que en la línea con el JAK2 mutado la  $EC_{50}$  fue de  $41 \pm 1$  nM, aunque siguió siendo menos activo que en pacientes, puesto que aquí tiene una  $EC_{50}$  con una mediana de 8 (2-24) nM. En el caso de BA/F3 JAK2 V617F el inhibidor de la ruta de señalización PI3K/Akt/mTOR, BEZ235 fue bastante más activo con una  $EC_{50}$  de  $153 \pm 154$  nM que en el caso de la línea celular silvestre  $0.9 + 1.2$   $\mu M$  y de los resultados obtenidos en pacientes  $0.747$  (0.054-5.852)  $\mu M$ .

### 3.2.- Actividad de la combinación de los fármacos con ruxolitinib

Para el estudio de la combinación de los distintos fármacos con ruxolitinib, se decidió añadir 100 nM de ruxolitinib en cada punto de la curva dosis respuesta y así estudiar el comportamiento de la curva en cuanto al cambio en la  $EC_{50}$  y  $E_{max}$  y la posible existencia de sinergia.

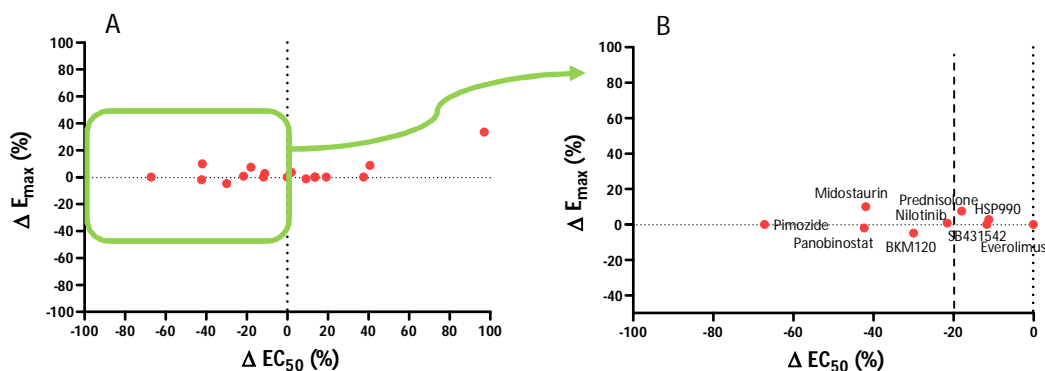
#### 3.2.1.- Pacientes

En el caso de muestras de pacientes se pudo ver que había fármacos cuya actividad se vio potenciada con el inhibidor de JAK2, como se puede ver en la tabla 39, donde se recogen aquellas potenciaciones con un DRI mayor de 2, o lo que es lo mismo, aquellas combinaciones en las que el ruxolitinib provocó una disminución de dosis de más de la mitad respecto al fármaco en solitario. Los fármacos que se vieron más potenciados por el ruxolitinib fueron la prednisolona, midostaurina y panobinostat.

COMBINACIÓN	DRI (Media)
PREDNISOLONA + RUXOLITINIB	110.1
MIDOSTAURIN + RUXOLITINIB	27.7
PANOBINOSTAT + RUXOLITINIB	27.0
BORTEZOMIB + RUXOLITINIB	17.8
AUY922 + RUXOLITINIB	14.4
BEZ235 + RUXOLITINIB	13.8
HSP922 + RUXOLITINIB	13.7
LCL161 + RUXOLITINIB	9.9
PONATINIB + RUXOLITINIB	9.5
PIMOZIDE + RUXOLITINIB	6.5
NILOTINIB + RUXOLITINIB	6.1
BKM120 + RUXOLITINIB	4.7
SP600125 + RUXOLITINIB	3.6

Tabla 39: Combinación de fármacos con un DRI mayor de 2.

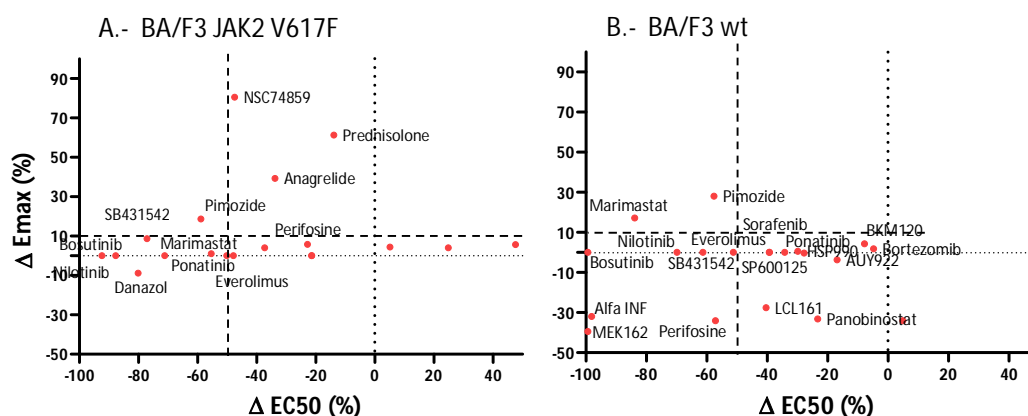
Después se decidió hacer un estudio de las variaciones de las  $EC_{50}$  y  $E_{max}$  y se pudo comprobar que lo que fundamentalmente varió fue la  $EC_{50}$ , mientras que la actividad máxima se mantuvo prácticamente invariable (Figura 25). Los fármacos que experimentaron un mayor cambio en su  $EC_{50}$  fueron pimozone (67,2%), panobinostat (42,3%), midostaurina (41,9%), BKM120 (30%), nilotinib (21,6%) y prednisolona (18,0%).



**Figura 25:** Representación del porcentaje de la diferencia en  $EC_{50}$  vs el porcentaje de la diferencia de  $E_{max}$  entre las curvas dosis respuesta con y sin 100 nM de Ruxolitinib después de 72 horas de tratamiento, en muestras de pacientes (A). Combinaciones de los fármacos que disminuyen más su  $EC_{50}$ .

### 3.2.2.- Líneas celulares: BA/F3 wt y BA/F3 JAK2 V617F.

En términos generales, las combinaciones con ruxolitinib lograron disminuir la  $EC_{50}$  de los fármacos, lo que indica un aumento de la potencia de la combinación con respecto al fármaco en solitario. Las combinaciones que mejor funcionaron presentando una disminución de la  $EC_{50}$  mayor del 50%, fueron bosutinib, nilotinib, SB431542, danazol, marimastat, ponatinib y pimozone en la línea con el JAK2 mutado (figura 26a). En la línea salvaje, además de las combinaciones ya mencionadas, hay que añadir otras como INF- $\alpha$ , MEK162 y perifosine (figura 26b).



**Figura 26:** Representación del porcentaje de la diferencia en  $EC_{50}$  vs el porcentaje de la diferencia de  $E_{max}$  entre las curvas dosis respuesta con y sin 100 nM de Ruxolitinib después de 48 horas de tratamiento, en la línea BA/F3 JAK2 V617F.

#### 4.- Estudio de la combinación ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.

Se decidió, de entre todas las combinaciones posibles, seguir estudiando la compuesta por ruxolitinib, nilotinib y prednisolona. El hecho de que la combinación ruxolitinib más nilotinib fuera una de las combinaciones con mejores resultados en la líneas celulares, pero sobretudo el que en pacientes estuviera dentro de los fármacos que consiguieron una mayor disminución de la  $EC_{50}$ , fueron fundamentales para decantarnos por este fármaco. Además, el nilotinib es un fármaco empleado ampliamente en LMC y, lo más importante, en el año 2008, Akmetshina y colaboradores (64) describieron la actividad antifibrótica del nilotinib en fibroblastos de piel.

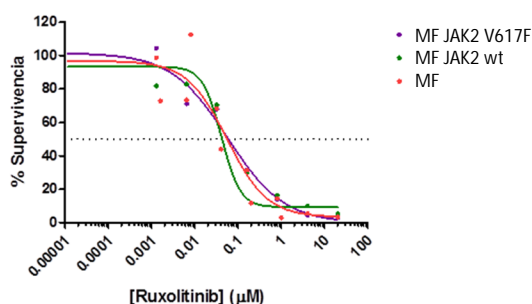
Por otro lado, también se decidió incluir en el estudio la prednisolona, el principio activo de la prednisona, ampliamente utilizada en clínica para el control de los síntomas de la enfermedad, además de ser el fármaco que consiguió una mayor reducción de dosis con el ruxolitinib para el mismo efecto en pacientes (tabla 39) y que parece disminuir los niveles de TGF- $\beta$  (59), uno de los factores de crecimiento responsable de los procesos fibrogénicos.

#### 4.1.- Estudio en pacientes

Como el cribado para la búsqueda de la combinación idónea se realizó cultivando las células mononucleadas de sangre periférica en metilcelulosa y las curvas dosis respuesta se llevaron a cabo posteriormente monitorizando las células mieloides CD13<sup>+</sup>, se decidió corroborar los resultados obtenidos realizando las curvas en metilcelulosa en presencia de los fármacos. Para que los resultados fueran comparables, también se decidió realizar una citometría de flujo viendo la viabilidad de las células CD13<sup>+</sup> después de dos semanas en cultivo. De esta manera se pudo integrar dos informaciones distintas: el número de colonias mieloides con el tamaño de éstas.

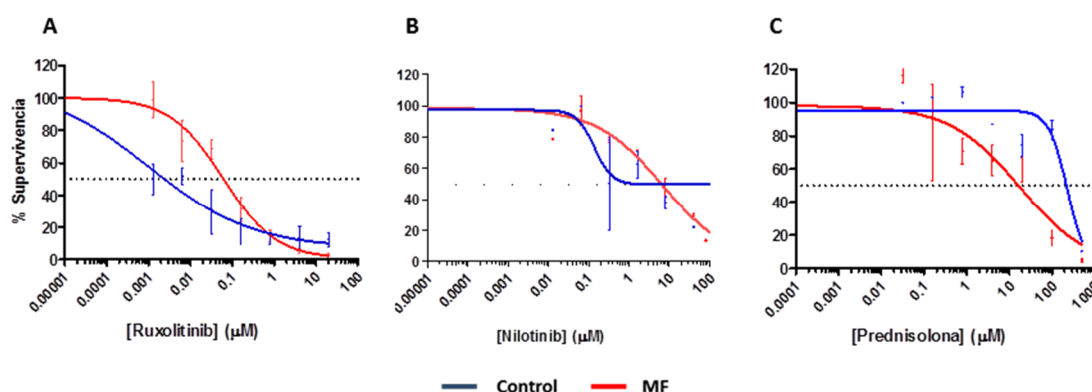
##### 4.1.1.- Fármacos en monoterapia

Lo primero que se comprobó fue el comportamiento frente a ruxolitinib de los cultivos de células de pacientes con MF con JAK2 V617F y los que lo presentaban un JAK2 salvaje. Se pudo ver que prácticamente poseían la misma EC<sub>50</sub>: 56nM de los que tienen la mutación frente a 41nM de los que no la tenían. Por lo que en los estudios de sinergia se decidió tratar ambos grupos como uno solo (EC<sub>50</sub> 55 nM) (figura 27).



**Figura 27. Curva dosis respuesta a ruxolitinib de pacientes con MF JAK2 V617F, MF JAK2 wt y la curva conjunta.**

La  $EC_{50}$  del nilotinib en las muestras ensayadas fue de  $6.6 \mu\text{M}$  y para la prednisolona fue de  $13.1 \mu\text{M}$  (figura 28). Una de las muestras no resultó ser sensible ni a nilotinib ni a prednisolona y otra de las muestras tampoco resultó ser sensible a prednisolona, pero si a ruxolitinib y nilotinib.



**Figura 28:** Curvas dosis respuesta de ruxolitinib (a), nilotinib (b) y prednisolona (c) en células mononucleadas de pacientes sembradas en metilcelulosa.

#### 4.1.2.- Estudio del comportamiento sinérgico entre ruxolitinib, nilotinib y prednisolona

Se encontraron sinergias en todas las combinaciones estudiadas, e incluso en 2 de ellas, todas las muestras de pacientes resultaron ser sinérgicas. Estas 2 combinaciones fueron ruxolitinib  $32 \text{ nM}$  más prednisolona  $4 \mu\text{M}$  (CI de  $0.45 \pm 0.21$ ; p-valor =  $0.0138$ ) y ruxolitinib  $160 \text{ nM}$ , nilotinib  $8 \mu\text{M}$  más prednisolona  $0.8 \mu\text{M}$  (CI de  $0.31 \pm 0.23$ ; p-valor =  $0.0023$ ) (tabla 40).

No se encontró comportamiento sinérgico en ninguna de las combinaciones estudiadas en la muestra que no presentaba sensibilidad a nilotinib ni a prednisolona.

Ruxolitinib( $\mu$ M)	32	32	160	160	32	32	160	160	32	32	160	160
Nilotinib ( $\mu$ M)	1.6	8	1.6	8					1.6	1.6	8	8
Prednisolona ( $\mu$ M)					0.8	4	0.8	4	0.8	4	0.8	4
MF	>2	1.44	1.83	1.55	>2	0.71	>2	>2	>2	>2	0.31	0.39
	0.50	0.18	1.05	0.4	0.1	0.53	0.17	0.27	>2	>2	0.64	>2
	1.09	0.30	0.32	0.22	0.80	0.24	1.47	0.98	0.36	0.15	0.20	0.13
	0.40	0.34	0.20	0.20	0.74	0.33	0.39	0.34	0.43	0.24	0.10	0.18
	0.22	0.55	0.16	0.05	0.18		0.15		0.10		0.02	
Controles	0.24	0.12	0.30	0.21	>2	>2	>2	0.97	>2	0.53	0.48	0.54
	0.20	0.13	>2	0.13	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2	>2

**Tabla 40: Índice de combinación (CI)** calculado según el artículo de Chou (1976)(74), de las muestras de pacientes con MF y de muestras de controles sanos en las combinaciones con distintas concentraciones de ruxolitinib, nilotinib y prednisolona. CI < 1 significa sinergia, C = 1, aditividad y CI > 1 antagonismo.

#### 4.2.- Estudio en líneas celulares

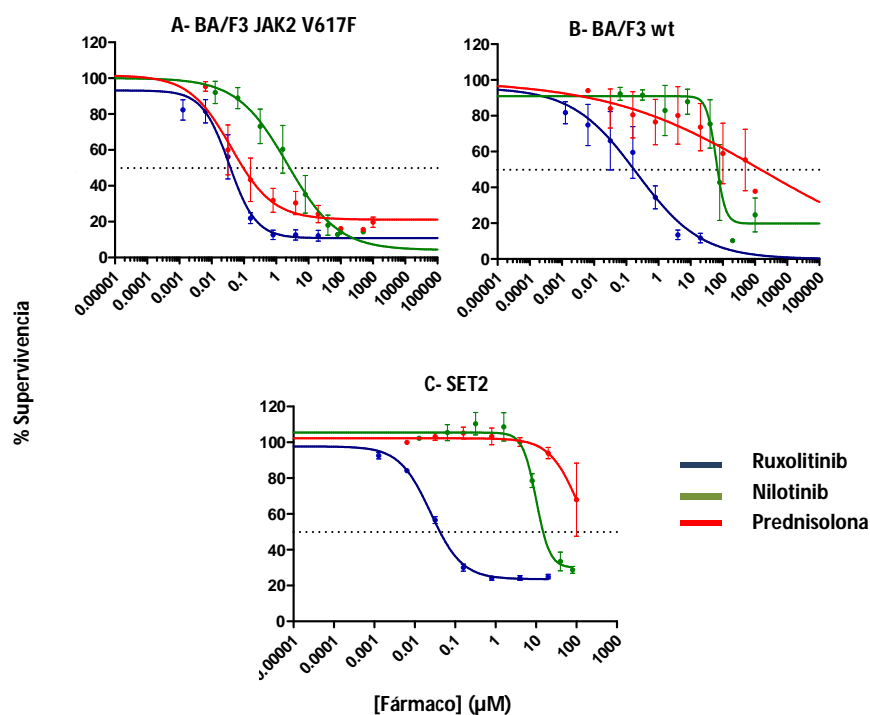
Para ahondar en el estudio del comportamiento de las combinaciones de los fármacos ruxolitinib, nilotinib y prednisolona se empleó la línea celular humana SET2, que presenta la mutación V617F en JAK2 y proviene de una leucemia megacariocítica. También se usó la línea BA/F3 JAK2 V617F y línea silvestre para el estudio, de manera que se podría determinar la importancia de la presencia de la mutación en JAK2 en la sensibilidad a los fármacos a estudio.

##### 4.2.1.- Fármacos en monoterapia

Parece que la mutación V617F en JAK2 confirió mayor sensibilidad a la línea BA/F3 frente a los fármacos testados en esta tesis. Era esperable que aumentara la sensibilidad a ruxolitinib: BA/F3 JAK2 V617F presentaba una  $EC_{50}$  de 35nM, mientras que la línea silvestre fue 212 nM. Pero también aumentó la sensibilidad a los otros dos fármacos, nilotinib y prednisolona: la  $EC_{50}$  para el nilotinib fue de 2.2  $\mu$ M y de 40 nM

para la prednisolona en la línea con la mutación, mientras que en la línea silvestre la  $EC_{50}$  de ambos fármacos fue mayor de 20  $\mu$ M (figura 29 a y b).

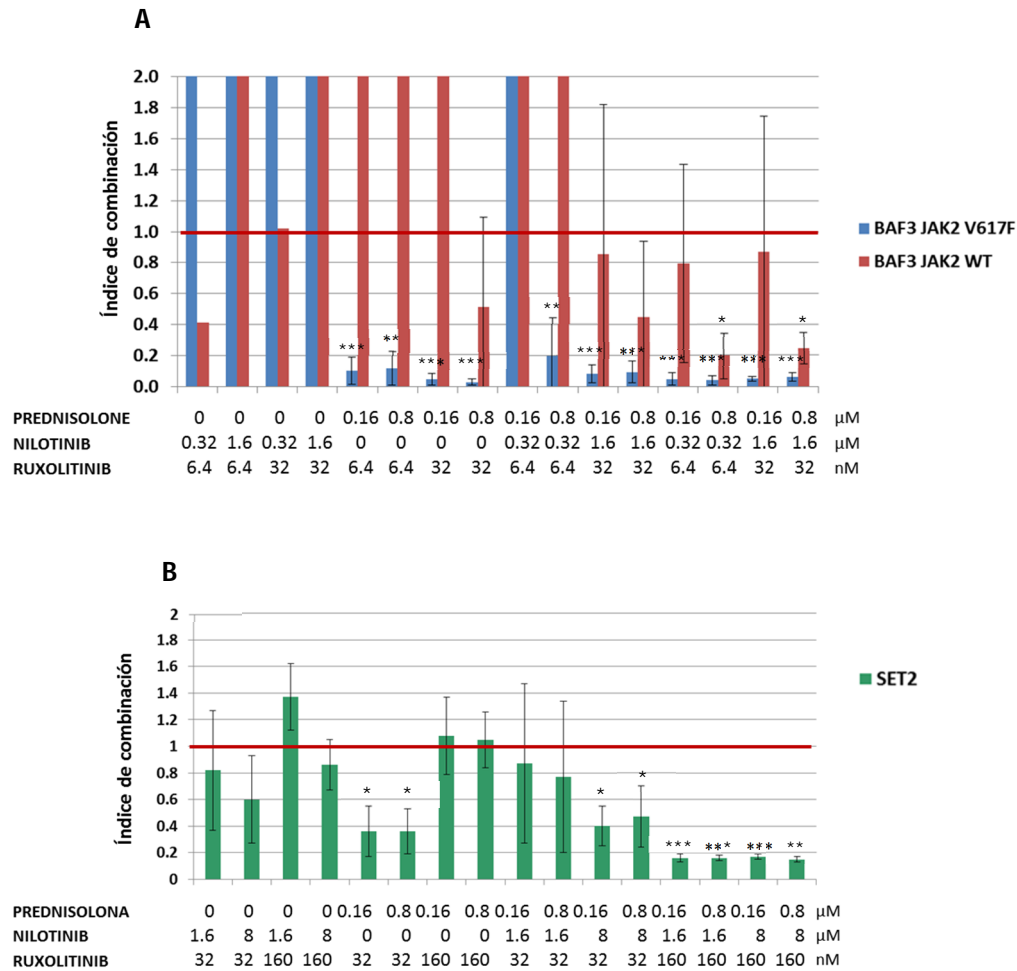
La línea SET2, que también tiene la mutación V617F en JAK2, fue más sensible ( $EC_{50}$  = 25nM) que la línea BA/F3 con la misma mutación y menos sensible a nilotinib y prednisolona con  $EC_{50}$  superiores a los 20  $\mu$ M (figura 29c).



**Figura 29: Curvas dosis respuesta de ruxolitinib, nilotinib y prednisolona en las líneas celulares BA/F3 JAK2 V617F, BA/F3 wt y SET2.**



4.2.2.- Estudio de la sinergia entre ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.



**Figura 30: Índices de combinación entre las distintas combinaciones de los fármacos ruxolitinib, nilotinib y prednisolona en las líneas celulares BA/F3 JAK2 V617F, BA/F3 wt (a) y SET2 (b).** CI < 1 significa sinergia, C=1, aditividad y CI>1 antagonismo. \*: p<0.05; \*\*: p<0.001; \*\*\*: p<0.0001.

Después de estudiar cada fármaco por separado, se estudió la existencia de comportamiento sinérgico en las distintas combinaciones entre ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.

Como se puede ver en la figura 30a, es muy interesante el hecho de que en 11 de las 16 combinaciones estudiadas se encontró un comportamiento sinérgico en la línea

celular BA/F3 con el JAK2 mutado. En el caso de las combinaciones triples, excepto una, experimentaron una fuerte sinergia. También se encontró una fuerte sinergia entre ruxolitinib y prednisolona en las cuatro combinaciones ensayadas, todas con un CI por debajo de 0.2. Mientras que en el caso de la línea silvestre tan solo en 2 se encontró un valor de CI por debajo del 1, ambos casos en la triple combinación

En el caso de la línea SET2, se pudo ver un débil comportamiento sinérgico en la combinación entre ruxolitinib y nilotinib; pero fue en la triple combinación cuando se observó una fuerte sinergia. En cambio sólo hubo una sinergia moderada cuando se estudió la combinación entre ruxolitinib y prednisolona (figura 30b).

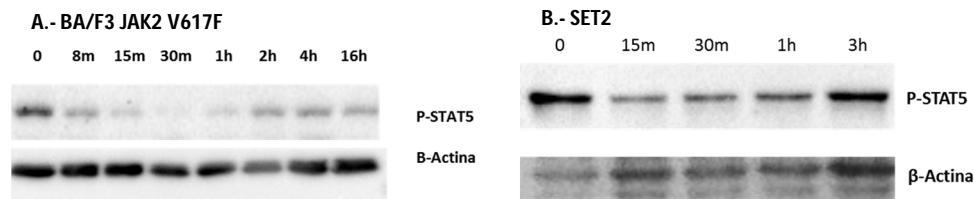
#### *4.2.3.- Estudio de las vías de señalización afectadas.*

Para hacer un estudio de las posibles rutas de señalización afectadas por los fármacos y sus combinaciones, se decidió emplear unas matrices de fosfoproteínas tirosinquinazas.

##### *4.2.3.1.- Optimización del tiempo de incubación de los fármacos.*

Antes de proceder al estudio con los matrices, determinamos el tiempo de actuación de los fármacos. Para ello se escogió la combinación que consistía en 32 nM de ruxolitinib, 1.6  $\mu$ M de nilotinib y 0.8  $\mu$ M de prednisolona porque mostró un comportamiento sinérgico tanto en BAF3 JAK2 V617F como en SET2, las líneas celulares que se utilizaron para el estudio de las vías de señalización afectadas por el tratamiento conjunto.

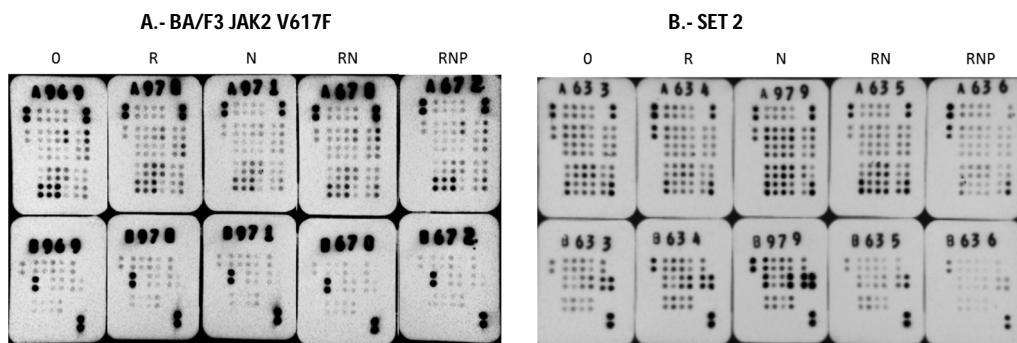
Se observó una inhibición de la fosforilación de STAT5 y una posterior recuperación a lo largo del tiempo. En BA/F3 JAK2 V617F el tiempo en el cual se registró la máxima inhibición de STAT5 fue a los 30 minutos (figura 31a), mientras que en SET2 la inhibición se produjo a partir de los 15 (figura 31b).



**Figura 31: Cinética de fosforilación** de STAT5 en BA/F3 JAK2 V617F (a) y SET2 (b) cuando se incubaron los cultivos con 32nM de ruxolitinib, 1.6  $\mu$ M de nilotinib y 0.8  $\mu$ M de prednisolona.

#### 4.2.3.2.- Estudio de fosforilación mediante *arrays* de fosfoproteínas.

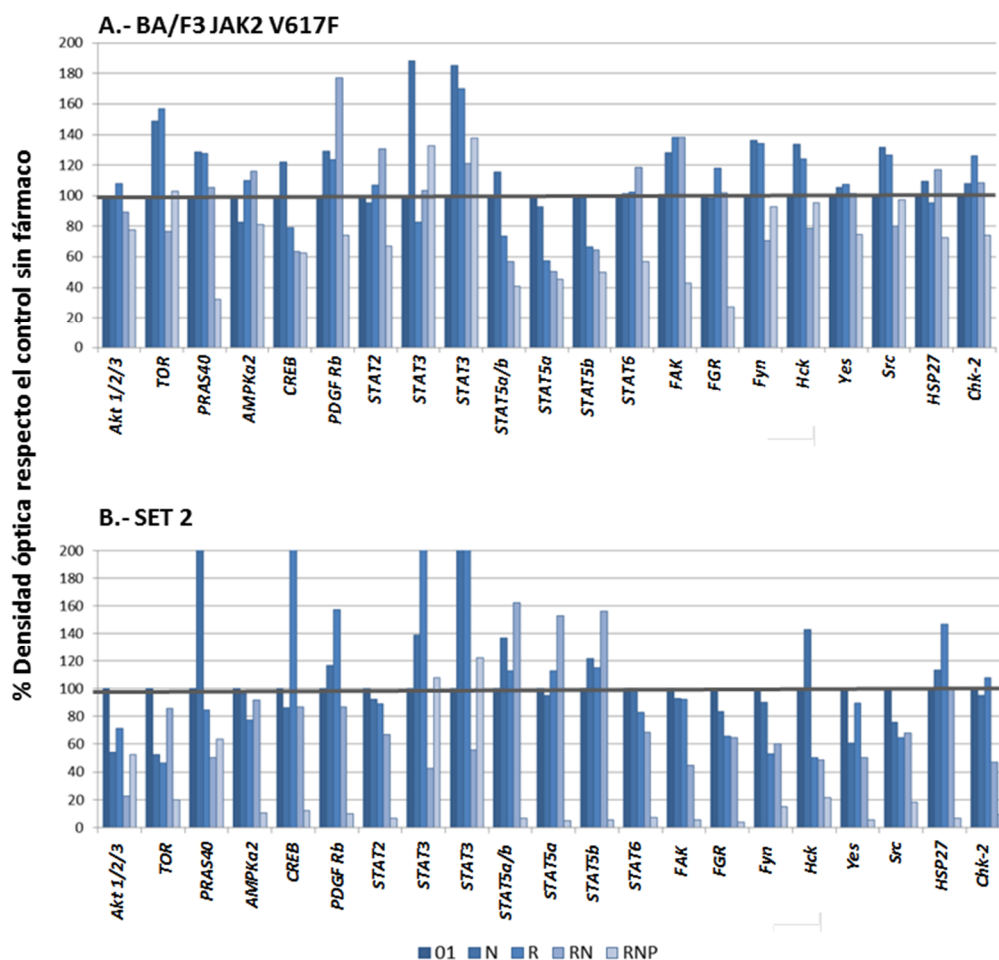
Después de haber determinado el tiempo de incubación óptimo para hacer el estudio de las vías de señalización afectadas por la combinación de los fármacos, se procedió al estudio con los *arrays* de proteínas fosforiladas (figura 32). El estudio se realizó tanto en BA/F3 JAK2 V617F como en SET2.



**Figura 32: Arrays de fosfoproteínas** realizadas en BA/F3 JAK2 V617F (a) y SET2 (b).

En la figura 33 a y b se encuentran representadas las proteínas en las que se encontraron cambios de fosforilación entre los distintos tratamiento a los 30 minutos de incubación, tanto en la línea celular BA/F3 JAK2 V617F como en SET2.

Como era de esperar, la ruta JAK/STAT se encontró inhibida cuando el ruxolitinib estaba presente, como se puede comprobar en la línea BA/F3 JAK2 V617F, en la que se llegó hasta un 60 % de inhibición en STAT5.



**Figura 33: Niveles de fosforilación de distintas proteínas relacionadas con rutas de señalización, chaperonas y proteínas relacionadas con la respuesta al daño en el ADN.** Membranas de los arrays con los distintos tratamientos de BA/F3 JAK2 V617F (a) y SET 2 (b). Densidad óptica de las proteínas en las que se ha encontrado diferencias entre tratamientos en de BA/F3 JAK2 V617F (c) y SET 2 (d). R: ruxolitinib, N: nilotinib; P: prednisolona.

En SET2, la vía de AKT/mTOR estaba bastante más inhibida que en el caso de la línea en BA/F3 JAK2 V617F, llegando a niveles de inhibición de hasta el 80%. La proteína PRAS40B también se encontró inhibida, aunque sobre todo en las combinaciones de

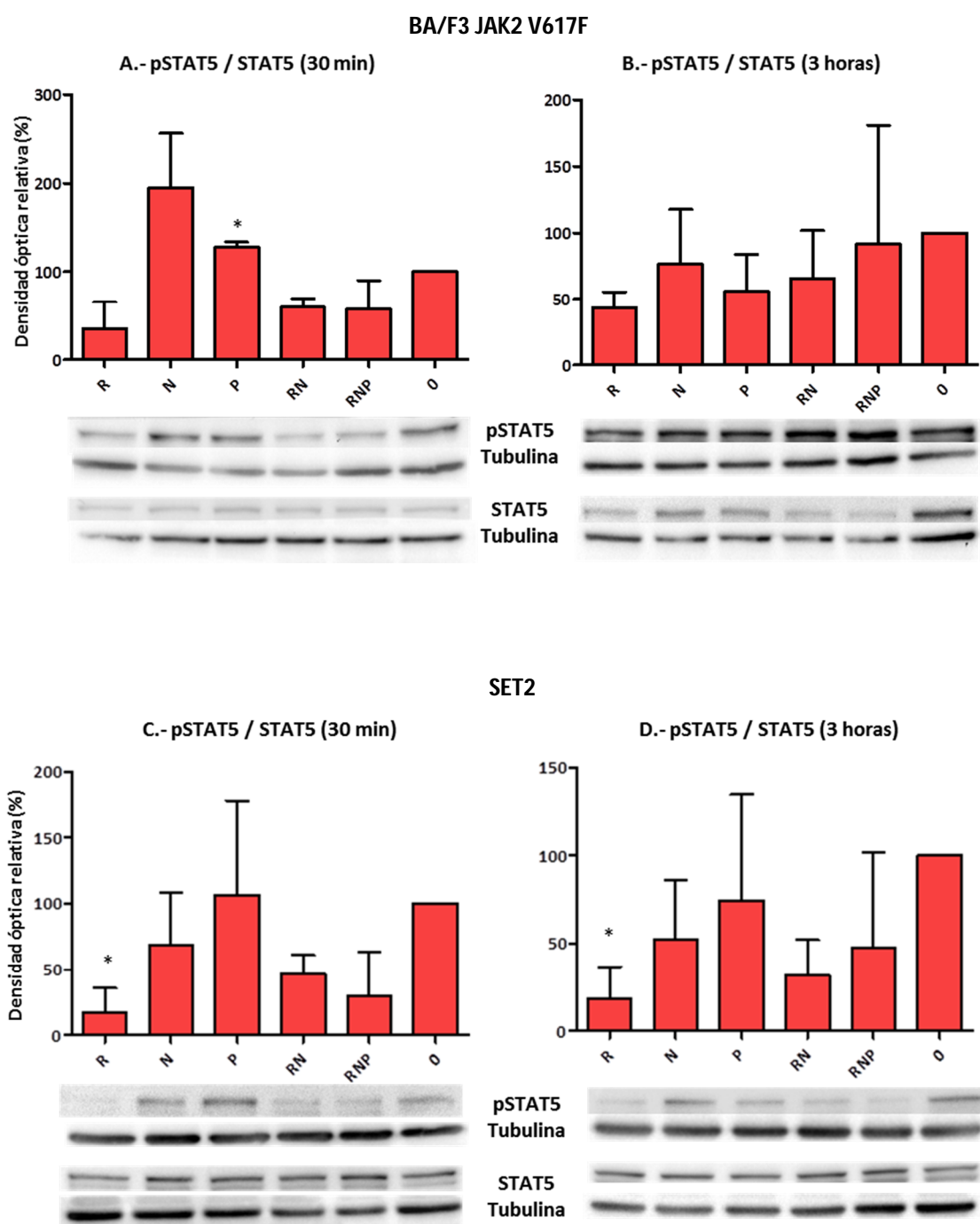
fármacos, con un 50 % de inhibición en la combinación ruxolitinib, nilotinib en SET2 y hasta casi un 70 % en la triple combinación en el caso de BA/F3 JAK2 V617F. La proteína PRAS40B forma parte de la vía AKT/mTOR, es componente del complejo I de mTOR (mTORC1), a la vez que es su sustrato y ejerce un poder inhibitorio sobre el complejo al disociarse cuando está fosforilado (77).

Otro grupo de proteínas en las que se dio una importante disminución de su nivel de fosforilación fueron las proteínas de la familia SRC (Fyn, Hck, Yes, FGR y SRC), como se pudo comprobar en la línea SET2. En la línea BA/F3 JAK2 V617F también se vio una disminución del nivel de fosforilación, pero esta vez fue en las combinaciones de fármacos y no superó el 40 % de inhibición.

A la vista de estos resultados, se decidió corroborar mediante western blot los niveles de fosforilación de STAT5, AKT, ERK y SRC.

#### 4.2.3.3.- Estudio de las vías de señalización JAK/STAT, AKT/mTOR, MAPK y SRC

La vía de señalización JAK/STAT se vio inhibida por ruxolitinib, como era de esperar, puesto que es un inhibidor específico de JAK1/2. Esto se observó con mayor intensidad en el caso de la línea SET2, con un porcentaje de inhibición de un  $83.2 \pm 10.8 \%$  (p-valor  $< 0.05$ ) a los 30 minutos, que se siguió manteniendo a las 3 horas con un  $82.0 \pm 10.8 \%$  (p-valor  $< 0.05$ ). Cuando se combinó el ruxolitinib con nilotinib en presencia o no de prednisolona, el porcentaje de inhibición disminuyó, aunque siguió manteniéndose en niveles por encima del 50 % de inhibición ( $RN_{30min}$ :  $53.0 \pm 13.8 \%$ ;  $RN_{3h}$ :  $68.3 \pm 20.4 \%$ ;  $RNP_{30min}$ :  $70.4 \pm 20.0 \%$ ;  $RNP_{3h}$ :  $52.8 \pm 31.5 \%$ ) (figura 34 c y d) (p-valor  $< 0.05$ ).

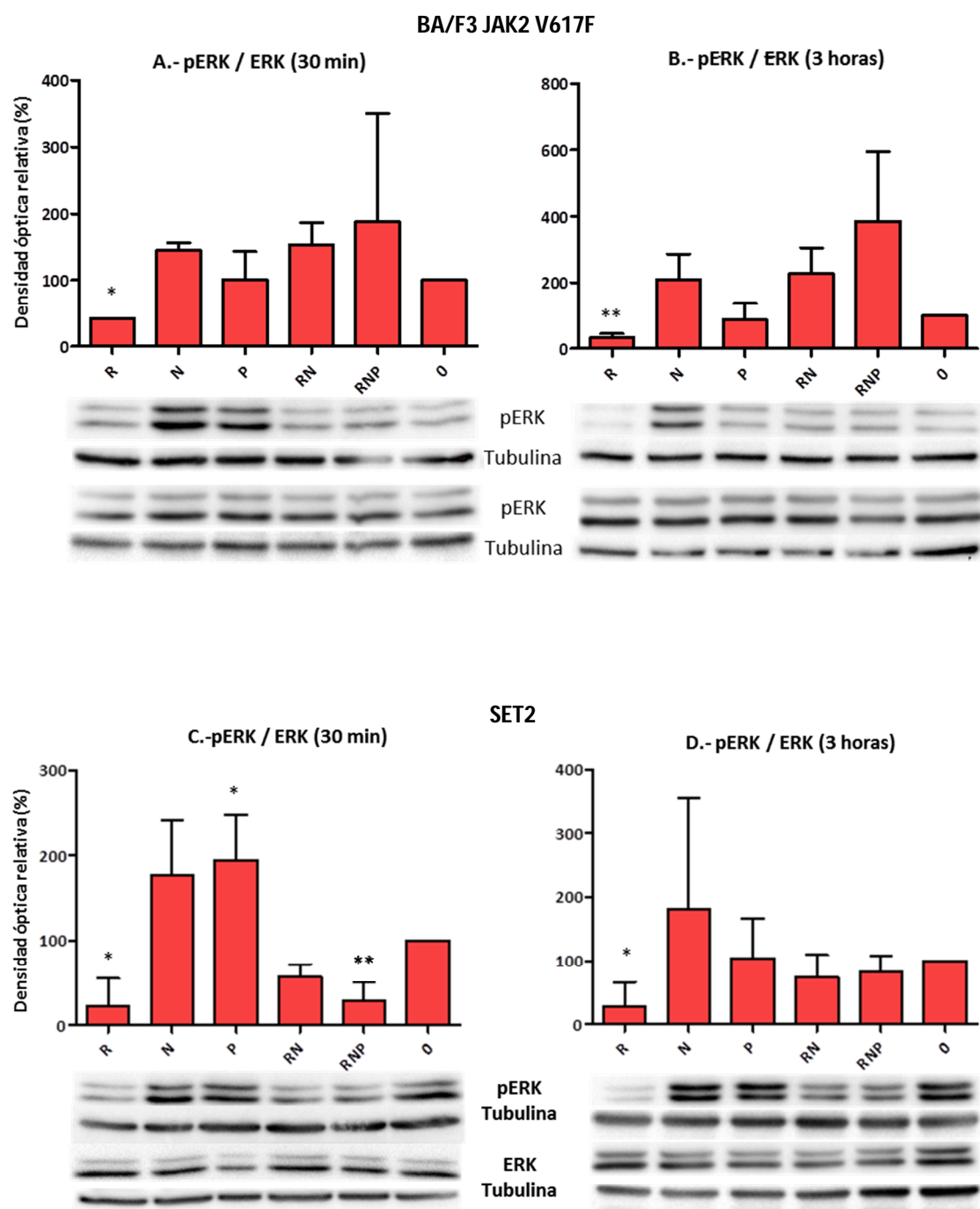


**Figura 34: Estudio de los niveles de fosforilación de STAT5** después de 30 (A y C) minutos o 3 horas (B y D) de tratamiento con 32 nM de ruxolitinib, 1.6  $\mu$ M de nilotinib, 0.8  $\mu$ M de prednisolona y sus combinaciones en las líneas celulares BAF3 JAK2 V617F (A y B) y SET2 (C y D). Se representa media y error estándar de los datos. \*: p-valor < 0.05; \*\*: p-valor < 0.01. R: ruxolitinib, N: nilotinib; P: prednisolona.

En el caso de BAF3 JAK2 V617F, la inhibición ejercida por el ruxolitinib fue un poco menos intensa, con una disminución de la inhibición de la fosforilación de STAT5 a los 30 minutos de  $65.1 \pm 18.0$  %. En este caso se observó una ligera tendencia a disminuir con el tiempo: a las 3 horas la inhibición fue de  $56.6 \pm 8.4$  %. En las combinaciones, la inhibición a los 30 minutos fue del orden del 40 % y se fue perdiendo con el tiempo: a las 3 horas disminuyó sobretodo en el caso de la triple combinación hasta casi desaparecer (figura 34 a y b).

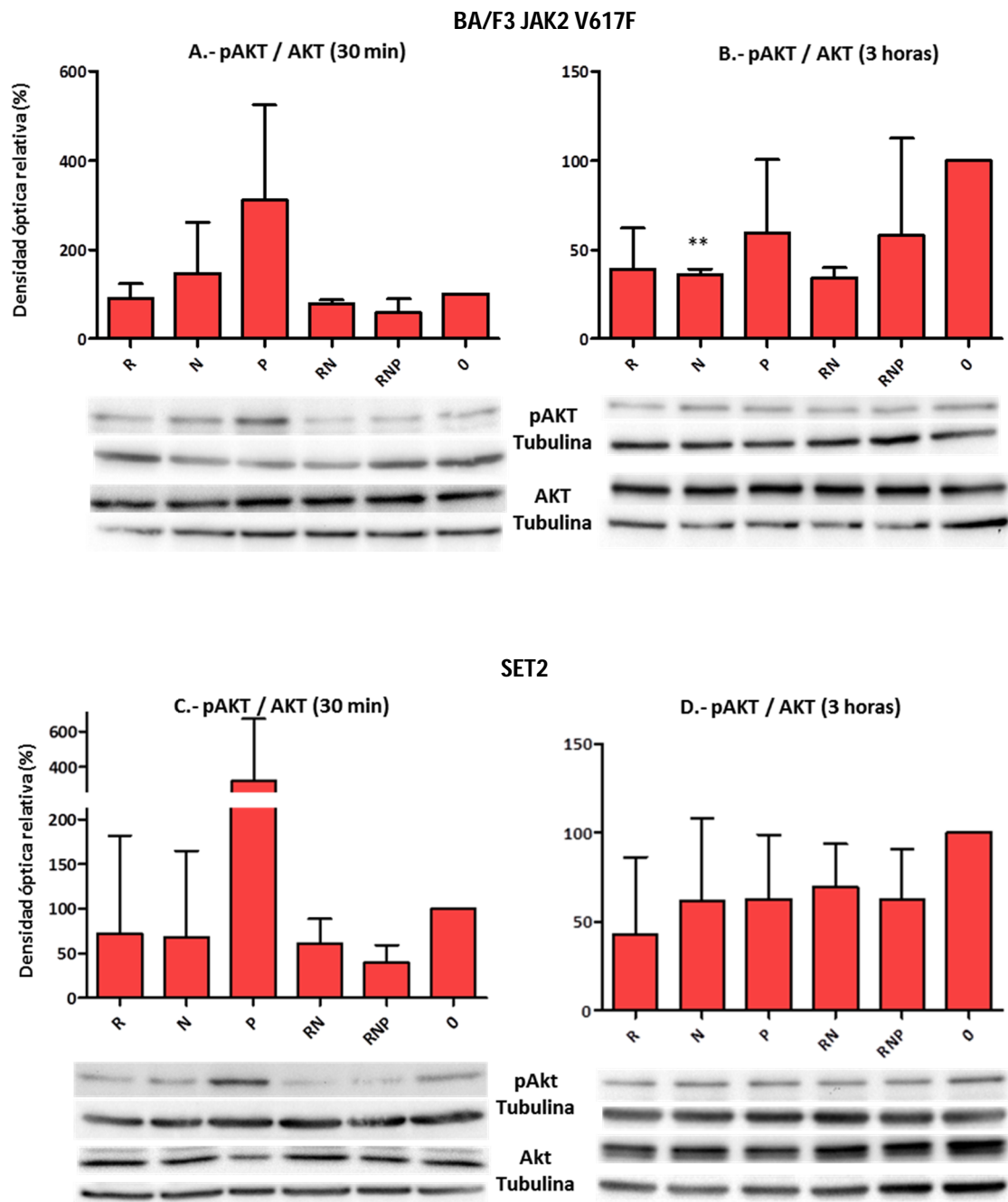
También se estudió la actividad de la vía de las MAPK evaluando los niveles de fosforilación de ERK. Parece que en BAF3 JAK2 V617F el único tratamiento que inhibió la vía fue el ruxolitinib, y sólo en solitario, mientras que el resto fomentaron su actividad (figura 35 a y b). En la línea SET2, el ruxolitinib inhibió la fosforilación de ERK en un  $77.7 \pm 16.4$  % a los 30 minutos y en un  $71.3 \pm 18.9$  % a las 3 horas. Pero en este caso la inhibición se produjo también en las combinaciones, probablemente debido a la presencia del ruxolitinib (RNP<sub>30min</sub>:  $70.8 \pm 11.2$  % (p-valor < 0.05); RN<sub>30min</sub>:  $42.6 \pm 14.4$  %), inhibición que se perdió a las 3 horas (figura 35 c y d).

En la línea murina, la vía de Akt necesitó más tiempo de incubación con los fármacos para ver su actividad inhibida: a los 30 minutos sólo la triple combinación consiguió una inhibición medianamente aceptable ( $42.3 \pm 21.8$  %) (figura 36 a). Mientras que a las 3 horas hubo una clara inhibición de la fosforilación de Akt por parte de todos los tratamientos, llegando a un 65.4% de inhibición en el caso de la combinación compuesta por ruxolitinib y nilotinib (figura 36 b). En cambio en SET2 la inhibición de la fosforilación ya se empezó a ver a los 30 minutos de incubación con los fármacos y se mantuvo en niveles similares a las 3 horas, sobre todo cuando el nilotinib se encontraba presente (figura 36 c y d).



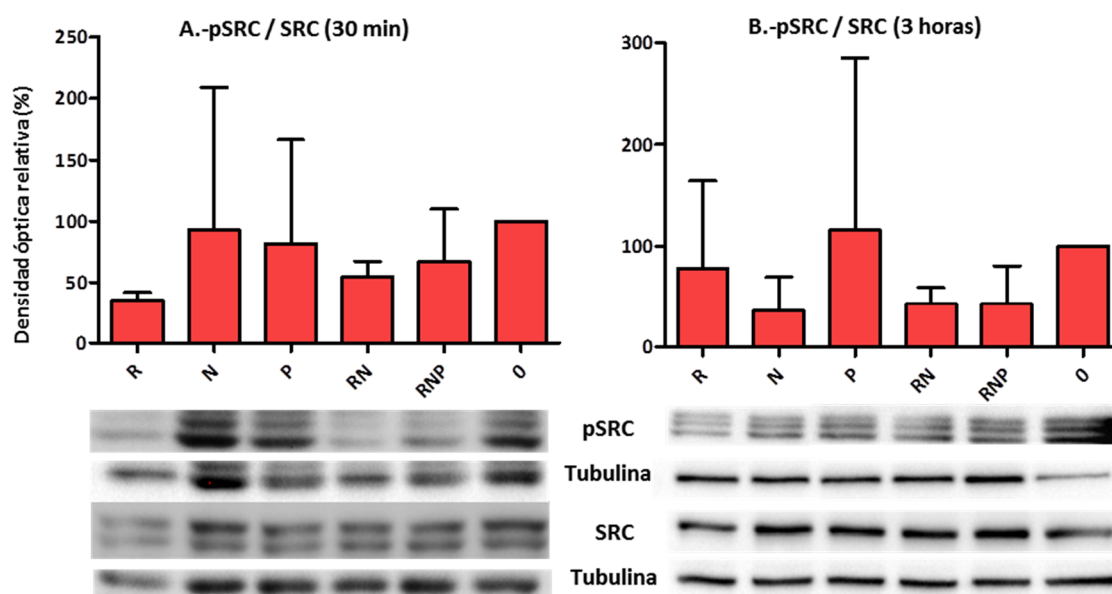
**Figura 35: Estudio de los niveles de fosforilación de ERK** después de 30 (A y C) minutos o 3 horas (B y D) de tratamiento con 32 nM de ruxolitinib, 1.6  $\mu$ M de nilotinib, 0.8  $\mu$ M de prednisolona y sus combinaciones en las líneas celulares BAF3 JAK2 V617F (A y B) y SET2 (C y D). Se representa media y error estándar de los datos. \*: p-valor < 0.05; \*\*: p-valor < 0.01. R: ruxolitinib, N: nilotinib; P: prednisolona.





**Figura 36: Estudio de los niveles de fosforilación de AKT** después de 30 (A y C) minutos o 3 horas (B y D) de tratamiento con 32 nM de ruxolitinib, 1.6  $\mu$ M de nilotinib, 0.8  $\mu$ M de prednisolona y sus combinaciones en las líneas celulares BAF3 JAK2 V617F (A y B) y SET2 (C y D). Se representa media y error estándar de los datos. \*: p-valor < 0.05; \*\*: p-valor < 0.01. R: ruxolitinib, N: nilotinib; P: prednisolona.

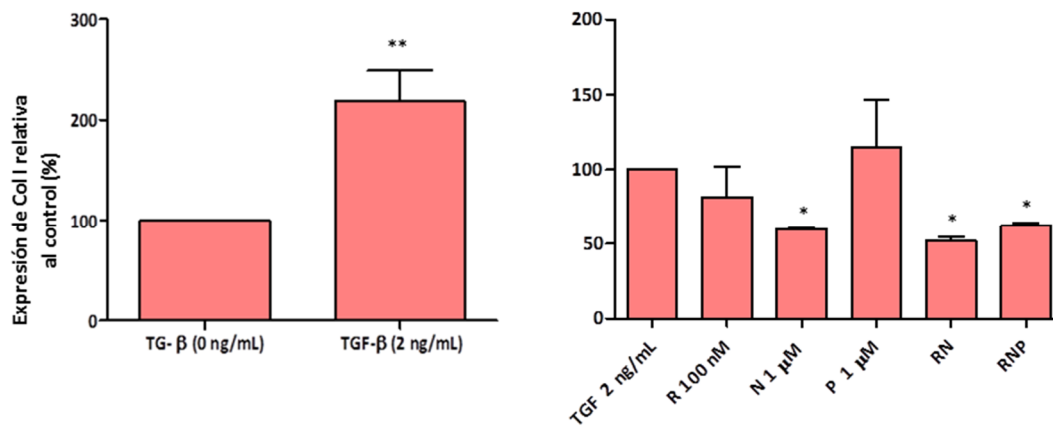
El ruxolitinib fue capaz de inhibir la fosforilación de las proteínas de la familia SRC a los 30 minutos en un  $64.9 \pm 4.8\%$ . Pero a las 3 horas es el nilotinib el que logra mantener la inhibición alrededor del 60 %, tanto en solitario como en combinación ( $N_{3h}$ :  $63.9 \pm 19.3\%$ ;  $RN_{3h}$ :  $57.1 \pm 16.3\%$ ;  $RNP_{3h}$ :  $57.2 \pm 22.0\%$ ) (figura 37).



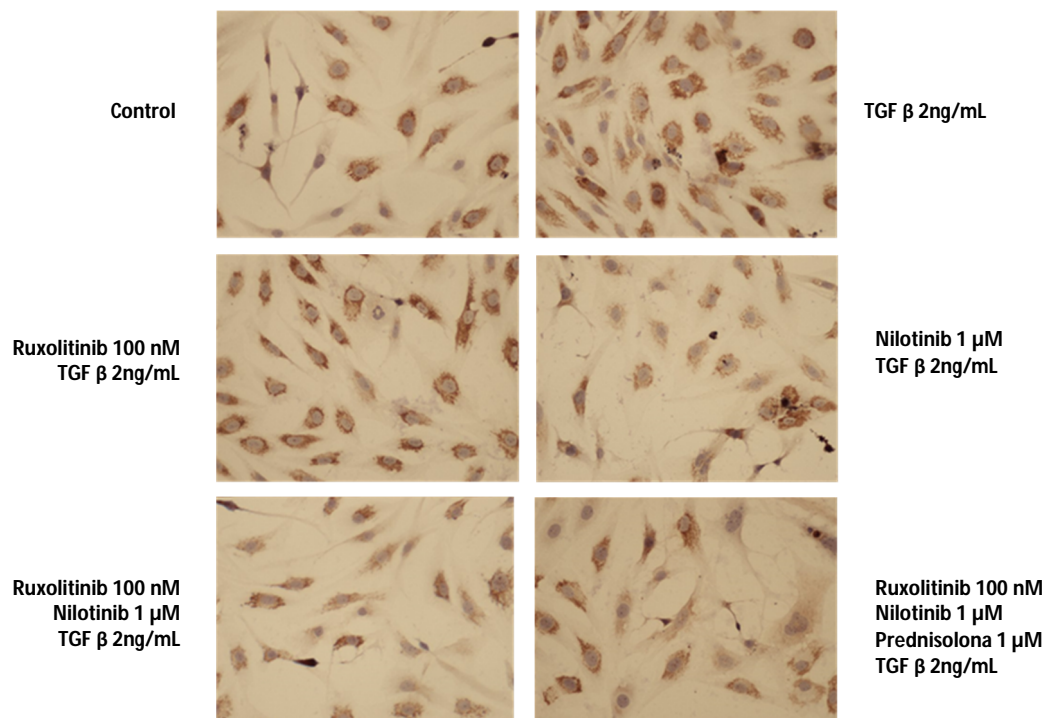
**Figura 37: Estudio de los niveles de fosforilación de SRC en la línea celular BAF3 JAK2 V617F** después de 30 (A) minutos o 3 horas (B) de tratamiento con 32 nM de ruxolitinib, 1.6  $\mu$ M de nilotinib, 0.8  $\mu$ M de prednisolona y sus combinaciones. Se representa media y error estándar de los datos. \*: p-valor < 0.05; \*\*: p-valor < 0.01. R: ruxolitinib, N: nilotinib; P: prednisolona.

#### 4.3.- Estudio del efecto de la combinación de nilotinib y ruxolitinib en la expresión de colágeno en fibroblastos de médula ósea.

El siguiente paso fue el estudio del poder antifibrogénico de ruxolitinib, nilotinib y prednisolona y sus combinaciones. Para ello se trataron células HS27a, una línea celular derivada de fibroblastos de médula ósea, durante una hora con los fármacos. Tras este tiempo se añadió al medio TGF- $\beta$ , un inductor de la síntesis de colágeno. El



**Figura 38: Expresión de ARNm de colágeno I** en HS27a después del tratamiento con ruxolitinib, nilotinib, prednisolona o sus combinaciones durante 1 hora. Después se añadieron 2 ng/mL de TGF-β y se incubó durante 24 horas. Se representa media y error estándar de los datos. \*: p-valor  $\leq 0.05$ ; \*\*: p-valor  $< 0.01$ . R: ruxolitinib, N: nilotinib; P: prednisolona.



**Figura 39: Expresión de colágeno I mediante inmunocitoquímica** en células HS27a tratadas con ruxolitinib, nilotinib, prednisolona o sus combinaciones durante 1 hora. Después se añadió 2 ng/mL de TGF-β durante 24 horas.

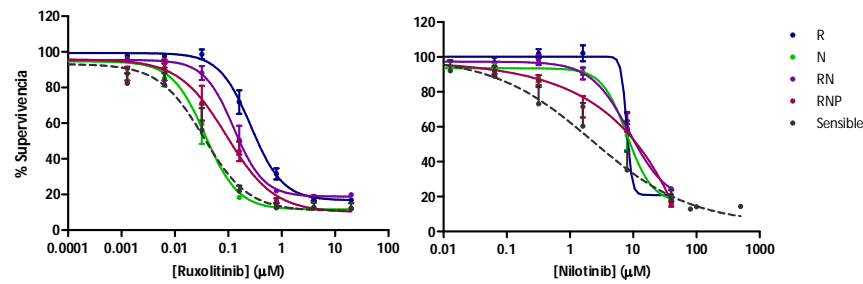
efecto inductor del TGF- $\beta$  de la expresión del colágeno I se pudo comprobar tanto por medición de la expresión de ARNm (figura 38) como por ICC (figura 39), donde se ve que llegó a duplicar los valores de colágeno I.

El nilotinib ( $39.8 \pm 0.9 \%$ ) ( $p < 0.05$ ) y las combinaciones (RN:  $48.1 \pm 2.9 \%$  ( $p < 0.05$ ); RNP:  $37.8 \pm 1.9 \%$  ( $p < 0.05$ )) consiguieron inhibir la expresión de COL1 inducido por TGF- $\beta$ . Resultados que se corroboraron por la ICC, donde se vio disminuido el número de células por campo (20X) cuando el cultivo se trató con nilotinib y con la combinación de nilotinib y ruxolitinib, así como el número de células teñidas y la intensidad de la tinción.

#### **4.4.- Estudio de resistencias a nilotinib, ruxolitinib y su combinación**

Para ver si era posible generar líneas resistentes a ruxolitinib, nilotinib, prednisolona y sus combinaciones, se procedió a cultivarlas con concentraciones crecientes de los fármacos hasta llegar a 1  $\mu$ M de ruxolitinib, 16  $\mu$ M de nilotinib y 1  $\mu$ M de prednisolona. Después de 30 días bajo esa presión selectiva, se procedió a realizar curvas dosis-respuesta a ruxolitinib y nilotinib.

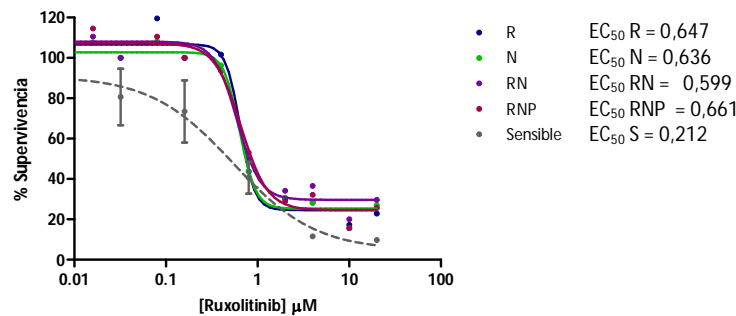
La línea sometida a ruxolitinib (BA/F3 R) poseía una  $IC_{50}$  de aproximadamente 7.5 veces la  $IC_{50}$  de la línea sensible, además de aumentar también en 3.5 veces la  $IC_{50}$  del nilotinib, lo que indica la existencia de resistencias cruzadas. Cuando la exposición a ruxolitinib se hizo en presencia de nilotinib (BA/F3 RN), la  $IC_{50}$  del ruxolitinib sólo aumentó 3.5 veces, al igual que la del nilotinib. Y cuando la línea resistente se generó con presencia de los tres fármacos, la  $IC_{50}$  del ruxolitinib sólo aumentó 2.7 veces, mientras que se hace completamente resistente a nilotinib, con una  $IC_{50}$  mayor de 10  $\mu$ M (figura 40, tabla 41).



**Figura 40:** curvas dosis-respuesta de a ruxolitinib y nilotinib de las líneas BA/F3 JAK2 V617F expuestas durante un mes a dichos fármacos y sus combinaciones. R: expuesto a ruxolitinib; N: expuesto a nilotinib; RN: expuesto a ruxolitinib y nilotinib; RNP: expuesto a ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.

Ruxolitinib	EC <sub>50</sub> (μM)	Nilotinib	EC <sub>50</sub> (μM)
Sensible	0,035	Sensible	2,220
R	0,268	R	7,869
N	0,037	N	8,018
RN	0,127	RN	8,697
RNP	0,093	RNP	>10

**Tabla 41:** EC<sub>50</sub> de las curvas dosis-respuesta de a ruxolitinib y nilotinib de las líneas BA/F3 JAK2 V617F expuestas durante a dichos fármacos y sus combinaciones. R: expuesto a ruxolitinib; N: expuesto a nilotinib; RN: expuesto a ruxolitinib y nilotinib; RNP: expuesto a ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.



**Figura 41:** curvas dosis-respuesta de a ruxolitinib de las líneas BA/F3 wt expuestas durante un mes a dichos fármacos y sus combinaciones. R: expuesto a ruxolitinib; N: expuesto a nilotinib; RN: expuesto a ruxolitinib y nilotinib; RNP: expuesto a ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.

En cambio, en la línea BA/F3 silvestre, cuando se expuso a los fármacos y sus combinaciones durante aproximadamente un mes, vio aumentada su EC<sub>50</sub> aproximadamente 3 veces en todos los casos (figura 41).

# DISCUSIÓN



## DISCUSIÓN

### 1.- Caracterización de los pacientes con MF mediante NGS

La carga mutacional de JAK2 V617F y las formas mutadas de CALR se asocian con el diagnóstico e influyen en parámetros hematológicos así como en la supervivencia global. Curiosamente se encontró que las cargas mutacionales de JAK2 V617F y de las mutaciones de CALR, independientemente del tipo que fueran, se asociaban con el tipo de diagnóstico de los pacientes: Las cargas mutacionales de JAK2 V617F fueron aproximadamente la mitad en los pacientes de MFP que las que presentaron los pacientes con PV-MF (figura 17). Algo similar pasaba en el caso de las cargas mutacionales de CALR: los pacientes de MFP con CALR mutado tenían cargas mutacionales de menos de la mitad que aquellos que eran diagnosticados de TE-MF (figura 17).

Si parece que la carga mutacional de JAK2 está relacionada con la cantidad de Hb, la de CALR lo está con el número de plaquetas. Esto se ve claramente en el caso de los pacientes de MFP estratificados por la presencia o no de mutaciones en CALR. El grupo con una mayor cantidad de plaquetas es la MFP que tiene CALR mutado. Al enfrentarlo con los otros dos grupos, MFP con JAK2 mutado y MFP doble negativo, se observaron diferencias significativas que, en la práctica clínica, se traduce en la posibilidad de tratar al paciente con dosis plenas o no.

La variedad en las manifestaciones clínicas, así como en la respuesta a fármacos, no puede ser explicada únicamente con las mutaciones en JAK2, MPL o CALR. Con el desarrollo de la tecnología NGS se están pudiendo secuenciar muchos más genes con una cantidad de muestra y tiempo bastante reducido. Los datos obtenidos por diversos grupos de investigación están mostrando que hay muchos más genes en juego que pueden servir para el diagnóstico y pronóstico de estas enfermedades, así como para dilucidar cuál es el mecanismo fisiopatológico subyacente.



Los genes que más frecuentemente se encuentran mutados en la patología mielofibrótica, a parte de aquellos que implican una activación constitutiva de la vía JAK/STAT, están relacionados con la regulación epigenética y el *splicing* del ARNm.

TET2 y ASXL1 son los genes que presentan variantes en un mayor número de pacientes con MF tanto en el presente estudio, como en otros realizados por el grupo de investigación de Haferlach y Meggendorfer en Alemania (78) o por el grupo de Westerman en Australia (79). Ambos genes están relacionados con la regulación epigenética, TET2 con la desmetilación de las islas CpG y ASXL1 con la modificación postraducciona de las histonas. Se ha demostrado que la metilación aberrante de genes supresores de tumores como p16, PTEN, SFRP o APC es uno de los mecanismos promotores de tumores (80). Además, Zhang y colaboradores vieron como la pérdida de función de TET2, potenciada con la de DNMT3a, produce una alteración en el patrón de metilación y expresión de genes en las HSC, induciendo una expansión de las mismas y generando un clon pre-leucémico (81). Aunque cuando la mutación de TET2 se produce después de la mutación en JAK2, CALR o MPL, está asociado con la transformación leucémica (37).

ASXL1 es el tercer gen en frecuencia de mutación la población estudiada (33%), inmediatamente después de TET2, corroborando otros estudios (82)(78). ASXL1 es también un regulador epigenético, reclutador del complejo PRC2, que es el encargado de la dimetilación y trimetilación de la histona H3 (39), por lo tanto ASXL1 está relacionado con la estructura de la cromatina. Otra de las funciones de esta proteína es servir como punto de interacción con enzimas deubiquitinasa, regulando de este modo los niveles de expresión del complejo (37). Se ha encontrado que mutaciones en ASXL1 empeoran el pronóstico de los pacientes y aumentan la frecuencia de transformación leucémica (37).

La interacción entre el complejo PRC23 y ASXL1 se establece por EZH2 (39), otro de los genes con una frecuencia de mutación relativamente alta en los pacientes con MFP (18,5%), pero no en PV-MF o TE-MF. En otros trabajos también encontraron paciente

con PV-MF con mutaciones en este gen (82), pero en ninguno de los casos en TE-MF (78).

Relacionado con el proceso de metilación del ADN, se encuentran las mutaciones en IDH1/2. Estas son enzimas que metabolizan el ácido tricarboxílico y que cuando se encuentran mutadas se rompe el balance en la producción del  $\alpha$ -KG y el 2-HG, aumentando la cantidad del 2-HG, un oncometabolito que inhibe la actividad de TET2 y, en general, de las demetilinas tanto del ADN como de las histonas (80). Las mutaciones en IDH1/2 resultaron menos frecuentes (4 pacientes sobre 27) corroborando otros estudios hechos sobre pacientes mielofibróticos (82)(78). Además, parece que las mutaciones en IDH1/2 están relacionadas con eventos hemorrágicos y la leucemización de los pacientes (83).

Patel y colaboradores (82) encontraron que los pacientes con al menos una mutación en ASXL1, EZH2 o IDH1/2 tenían menos probabilidades de tener una respuesta esplénica y que mutaciones en ASXL1, DNMT3A o EZH2 pero no IDH1/2, estaban relacionados con una disminución en el tiempo de tratamiento antes de la discontinuación del mismo o de la muerte, además de estar asociado con una menor supervivencia global. Estos datos avalan la tendencia de presentar una supervivencia global menor en pacientes con al menos una mutación en TET2, ASXL1, EZH2 e IDH1/2 (genes relacionados con la regulación epigenética de la expresión génica) que se detectan en la reducida muestra de pacientes analizados en el presente trabajo. Esto podría estar relacionado con otra tendencia observada, la de tener menos número de plaquetas al diagnóstico, lo que redundaría en no poder recibir dosis plenas de tratamiento, sobretodo en el caso de ruxolitinib, y por tanto disminuiría la eficacia del tratamiento e impediría el aumento de la supervivencia.

Mutaciones en genes relacionados con el *splicing* están relacionados con un peor pronóstico, sobre todo en el caso de SRSF2 (39). Curiosamente, el gen PRPF40B, que no ha sido estudiado previamente en MF, estaba mutado en un 22.2 % de los pacientes secuenciados en este trabajo. Esta proteína es capaz de modular el *splicing*

alternativo de ARNm de Fas y Bcl-x, entre otros, claves en el control de la apoptosis celular (84).

Uno de los hallazgos encontrados fue que aquellos pacientes con más de 3 mutaciones en los genes secuenciados presentaban una menor cantidad de Hb al diagnóstico y una tendencia a una supervivencia global menor que aquellos que tenían menos mutaciones. Resultados corroborados por Patel y colaboradores (82). Además encontraron que los pacientes con al menos 3 mutaciones, tenían menos probabilidades de tener una respuesta esplénica.

Según los resultados obtenidos por Patel y colaboradores (82), los genes que parece que tenían más repercusión en la duración de la respuesta a ruxolitinib eran aquellos relacionados con la regulación epigenética de la expresión génica, lo que va en consonancia con los resultados obtenidos en la presente tesis, en los que no se han encontrado tiempos de duración de la respuesta a ruxolitinib mayores de 6 meses en los pacientes con al menos una mutación en este tipo de genes, mientras que en el resto de pacientes la mediana de la duración de la respuesta llegó a ser mayor, e incluso mayor de 25 meses en dos de estos pacientes.

### **2.- Estudio de la sensibilidad ex vivo de muestras de pacientes de MF a ruxolitinib**

Se ha explorado la posibilidad de establecer un modelo *ex vivo* para el estudio de sensibilidad a ruxolitinib. En primer lugar se optimizaron varios sistemas para captar la sensibilidad *in vitro* a ruxolitinib. La diferencia de actividad de ruxolitinib en los distintos modelos se debe al modelo celular en sí mismo y en que con cada uno se monitorizan células y procesos diferentes.

Tanto en el modelo directo como en el de amplificación de células mieloides la  $EC_{50}$  del ruxolitinib fue de un orden de magnitud mayor que en el caso del modelo clásico de crecimiento de colonias en metilcelulosa. Esto puede ser debido a que en cada modelo se ven afectados diferentes procesos. En el modelo de amplificación de células

mieloides se está viendo la actividad del ruxolitinib sobre células diferenciadas CD13<sup>+</sup>, mientras que en el caso del modelo directo lo que se monitoriza es la viabilidad de los progenitores CD34<sup>+</sup>. En el modelo clásico se estudian dos procesos: se ve el efecto del ruxolitinib sobre la capacidad de los HSC de formar colonias así como su propia supervivencia.

El modelo de elección para la estratificación de los pacientes en respondedores o no o, incluso, respondedores de larga duración, sería el modelo directo, en el que la manipulación de la muestra es mínima, se trabaja con progenitores directamente y el tiempo de análisis es el menor de los tres modelos, pero sobre todo porque es el que mejor discrimina los respondedores y los respondedores de larga duración. Pero tiene el inconveniente de que sólo se pueden testar uno o dos fármacos como mucho por muestra de paciente, lo que es un factor limitante. Es importante señalar que el modelo de amplificación también podría servir para el estudio de sensibilidad a fármacos porque, además de discernir aquellos pacientes que podrían tener una respuesta duradera, se podrían obtener el suficiente número de células para poder realizar el ensayo de un número importante de ellos.

La baja significación de las pruebas estadísticas se debió al reducido tamaño muestral, pero en una fase posterior del proyecto se pretende aumentar para corroborar, dentro del contexto de un ensayo clínico, los resultados que se perfilan en la presente tesis.

### **3.- Búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib**

Actualmente el ruxolitinib es la mejor opción para el tratamiento de la MF porque, además de ser un inhibidor específico de JAK1/2, y por tanto de la ruta JAK/STAT, ruta que está sobre activada en las NMPc, es el único de los inhibidores de JAK2 que ha demostrado ser eficaz en la disminución de la esplenomegalia, en la resolución de síntomas constitucionales así como en aumentar significativamente la supervivencia global respecto las terapias convencionales y es la única terapia aprobada para el tratamiento de las NMPc. Pero por otro lado, debido a su efecto mielosupresor,

provoca anemia y trombocitopenia, por lo que los pacientes no se llegan a hacer transfusionalmente independientes y hace difícil tratarlos con dosis plenas. Además, parece que aumenta el riesgo de padecer infecciones y no consigue remisiones completas desde el punto de vista histopatológico y molecular (61).

El objetivo de administrar el ruxolitinib en combinación con otro fármaco nace a raíz de las deficiencias descritas en el párrafo anterior, por lo cual se trata de disminuir la anemia y trombocitopenia además de perseguir el aumento de la eficacia del tratamiento intentando llegar a respuestas moleculares, desaparición de la fibrosis y aumento de la duración de la respuesta.

Para realizar la búsqueda de la mejor terapia combinada con ruxolitinib se realizó un análisis de sinergia con 28 fármacos de diversos tipos (tabla 17): Inhibidores de rutas de señalización relacionadas con la ruta JAK/STAT como PI3K/Akt/mTOR y MAPK/ERK; inhibidores de receptores tirosinquinasa como FLT3 o c-kit; inhibidores de los receptores de PDGF y TGF- $\beta$ ; también se emplearon fármacos utilizado tradicionalmente para el tratamiento de NMPc, como danazol, INF- $\alpha$  o anagrelide entre otros; y por último, introducimos en el análisis otros tipos de inhibidores que están probando en leucemias B (HSP990), mieloma (bortezomib, pomalidomida) o tumores sólidos (HSP990).

La actividad del ruxolitinib en el modelo empleado tuvo una actividad intermedia baja respecto a muchos de los fármacos que se ensayaron. Esta baja eficacia respecto a los resultados en el modelo convencional puede deberse a que el ruxolitinib es más eficaz sobre células menos diferenciada, que es lo que, en definitiva, se monitoriza en los modelos convencionales. Mientras que en el modelo empleado en esta fase de la investigación, el modelo de amplificación, enfrenta las células mieloides CD13<sup>+</sup> al ruxolitinib. Estas células más diferenciadas, sin capacidad de generar colonias, no deben de tener tan activa la ruta JAK/STAT. Por esta razón el ruxolitinib no tiene la misma eficacia que en células progenitoras.

En cuanto a la baja eficacia del ruxolitinib en las líneas celulares, con una diferencia de un orden de magnitud en la  $EC_{50}$ , entre los experimentos realizados con citometría de flujo midiendo supervivencia (descartando las células apoptóticas anexina V positivas), y aquellos en lo que se monitoriza la actividad de la cadena respiratoria (experimentos con WST-8), puede deberse a que el punto en el que se considera una célula viable es diferente. Los cambios a nivel de la cadena respiratoria mitocondrial son anteriores a los que tienen lugar en la membrana plasmática, cuando se rompe la asimetría y se expone la fosfatidil serina en la cara externa de la membrana plasmática, que es a lo que se une la anexina.

Los fármacos más activos en monoterapia tanto en pacientes como en líneas celulares fueron el inhibidor de histona deacetilasa (panobinostat) y el inhibidor del proteasoma (bortezomib). Ambos fármacos se presentaron como buenos candidatos para el tratamiento de la MF en monoterapia, pero han presentado serios problemas de toxicidad. Parece que el modelo celular empleado es capaz de detectar aquellos fármacos que en la práctica clínica pueden ser más eficaces, aunque en este caso, su desarrollo ha sido complicado por la toxicidad asociada.

El bortezomib es un inhibidor del proteasoma de primera generación, aprobado por la FDA para el tratamiento del mieloma múltiple (68). Prometía ser un buen tratamiento para la MF desde dos puntos de vista esenciales: parecía que inhibía la proliferación inhibiendo la actividad de NF-kappaB y provocaba la apoptosis en la línea megacarioblástica MO7-e, además de reducir la fibrosis en la médula ósea mediante la disminución de la expresión de TGF- $\beta$  (69). Pero cuando se llevó a la práctica clínica, se observó un alto grado de toxicidad y nula actividad en dosis no tóxicas (85).

El panobinostat es un pan-inhibidor de deacetilasas, por lo que promueve la acetilación de histonas que, en última instancia, provocan cambios en la estructura de la cromatina y estimulan la expresión de genes supresores de tumores induciendo la apoptosis en los HSC (86). Sorprendentemente se demostró que disminuía la expresión de JAK2 debido a la hiperacetilación de la chaperona encargada de plegar a JAK2, HSP90, lo que a su vez promovía su degradación (71). En 2013 se demostró su eficacia

en monoterapia en modelos murinos disminuyendo el volumen esplénico y la cantidad de glóbulos blancos en sangre periférica (87), resultados que se vieron confirmados en ensayos clínicos fase II, aunque con problemas de toxicidad. Estos problemas se vieron aliviados con una disminución de dosis y tratamientos prolongados en ensayos clínicos posteriores (88)(89).

Siguiendo en la línea del panobinostat, también se decidió introducir los inhibidores de HSP90, AUY922 y HSP990, dentro de los fármacos a testar. Presentaron una potencia en monoterapia del mismo orden que el panobinostat o el bortezomib, y cerca del 100% de eficacia en líneas celulares. HSP990 ya demostró ser eficaz frente a varios tipos de cánceres *in vitro*, entre ellos la LMA (90) debido a que ayuda al plegamiento de varias proteínas de rutas de señalización celular relacionadas con procesos neoplásicos como BCR-ABL, FLT-3, además de JAK2 como se ha señalado más arriba (70). En estudios preclínicos se ha visto que es capaz de inhibir el crecimiento de líneas celulares o células primarias con la ruta JAK/STAT hiperactivada (con mutaciones JAK2 V617F o MPL W515L) inhibiendo tanto la fosforilación como la expresión de JAK2, STAT5 o MAPK, además de disminuir el hematocrito y la hematopoyesis extramedular en ratones (91). Hay controversia en cuanto a si la combinación entre el HSP990 e inhibidores de JAK2 tienen un comportamiento sinérgico o no (91) (92). Nuestros resultados apoyarían a los grupos que sostienen que el comportamiento de dicha combinación no es sinérgico.

Los fármacos que tuvieron mejores respuestas en solitario no tuvieron los mismos resultados en combinaciones. Porque ya eran muy activos por si solos y la incorporación del ruxolitinib no supuso una mejora cuantitativa. Además, los fármacos de este grupo que se han llevado a la práctica clínica han resultado tener problemas de toxicidad presumiblemente debido a su gran actividad y baja especificidad celular.

Quince de los veintiocho fármacos disminuyeron en más de un 50% su  $EC_{50}$  en presencia de 100nM de ruxolitinib en líneas celulares o más del 20% en pacientes. La mayoría de estos fármacos eran inhibidores de rutas de señalización relacionadas con la vía JAK/STAT.

Bar-Natan y colaboradores (72) encontraron que la combinación de pimozide, inhibidor específico de STAT5, con inhibidores específicos de JAK2 presentaban un comportamiento aditivo, lo que va en consonancia con nuestros resultados en los que tanto en muestras de pacientes como en las líneas celulares se disminuyó alrededor de un 60% la  $EC_{50}$  del pimozide en presencia de ruxolitinib. La aditividad se puede explicar por el hecho de que ambos fármacos inhiben la misma ruta de señalización, aunque a distintos niveles.

La actividad del panobinostat tiene un amplio rango de mecanismos de acción. Como inhibidor de histonas deacetilasas afecta a la regulación epigenética de la expresión génica inhibiendo el ciclo celular e induciendo la apoptosis (71). También es capaz de fomentar la acetilación de otro tipo de proteínas como chaperonas, por ejemplo la chaperona HSP90, que tiene como cliente a JAK2, pero también otras proteínas relacionadas con la señalización celular como RAF-1 o Akt (71). Por lo tanto uno de los mecanismos del panobinostat es impedir la actividad de la chaperona HSP90 y por tanto el plegamiento de JAK2. Así la combinación de ruxolitinib y panobinostat debería inhibir radicalmente la señalización por la ruta JAK/STAT a la vez que trastoca otros muchos puntos de la biología celular. La combinación con ruxolitinib logró disminuir su  $EC_{50}$  más del 40% de su valor en solitario, resultados que van en la línea de los obtenidos por otros grupos en los que se encontró un comportamiento sinérgico (71). Actualmente hay un ensayo clínico fase Ib (NCT01433445) y fase I/II (NCT01693601) para el tratamiento de MF, ambos activos a la espera del análisis final.

La mayoría de los fármacos que han conseguido disminuir su  $EC_{50}$  más del 20 % en pacientes y más del 50% en las líneas celulares, corresponden a fármacos que inhiben las dos rutas de señalización más relacionadas con la vía JAK/STAT: Inhibidores de la ruta PI3K/Akt/mTOR como el burparlisib (PI3K), everolimus (PI3K/mTOR) y perifosine (Akt) y el inhibidor de la vía de las MAPK, MEK162 (MEK)(93). El probable mecanismo por el cual las combinaciones logran una reducción de la  $EC_{50}$  es la inhibición simultánea de las rutas en cuestión en cada caso, de manera que se evita la sobreexpresión y/o sobre activación de las rutas relacionadas como mecanismo



compensatorio. La combinación de buparlisib más ruxolitinib se encuentra en ensayo clínico fase Ib para el tratamiento de la myelofibrosis (NCT01730248). En ensayos preclínicos se ha encontrado un comportamiento sinérgico entre el everolimus y el ruxolitinib (94) pero no con el perifosine (95).

El grupo de fármacos que más ha aumentado su actividad en presencia de ruxolitinib ha sido el de los inhibidores de BCR/ABL nilotinib, bosutinib y ponatinib. El nilotinib es, además, un inhibidor específico de PDGFR, cKIT y la familia SRC (96)(97). El bosutinib, un mimético de ATP, además ser inhibidor de BCR/ABL, inhibe eficazmente la familia de proteínas SRC (97). Por último, el ponatinib, inhibidor de BCR/ABL de tercera generación, es un inhibidor de amplio espectro incluyendo la quinasa ABL, la familia SRC, FGFR, VEGFR-1/2/3 y FLT3 entre otros (97). Los tres fármacos nilotinib, bosutinib y ponatinib fueron aprobados para el tratamiento de la LMC, aunque el ponatinib aún no está aprobado, se puede usar en uso compasivo, pero su desarrollo está siendo complejo debido a eventos adversos relacionados con eventos vasculares oclusivos y toxicidad hepática (98).

De los fármacos que se emplean en el tratamiento habitual de la MF, el único que mejoró su  $EC_{50}$  en muestras de pacientes fue la prednisolona, que, además, obtuvo el DRI más alto. También parece que inhibe la expresión de uno de los factores de crecimiento responsables de la síntesis de colágeno I, el TGF- $\beta$  (59).

De todos los fármacos estudiados, el único que disminuyó su  $EC_{50}$ , tanto en células primarias de pacientes como en las líneas celulares, fue el nilotinib. Eso acompañado de que, además, es inhibidor no sólo de BCR/ABL, sino también de c-KIT, receptor tirosinquinasa relacionado con la capacidad de auto-renovación y diferenciación de la HSC (99)(100), y de la familia de quinasas SRC (96), relacionadas con las rutas de señalización JAK/STAT, PI3K, MAPK, PDGFR y VEGFR y del receptor PDGFR. Curiosamente, el PDGF es una de las citoquinas implicadas en los procesos fibróticos característicos de la MF (46); además, en estudios en fibroblastos de piel se demostró la capacidad antifibrogénica del nilotinib en piel (63)(64), hígado (65) y músculo (66).

Teniendo en cuenta todo lo discutido, decidimos seguir estudiando la combinación de fármacos ruxolitinib, nilotinib y prednisolona.

#### **4.- Estudio de la combinación ruxolitinib/nilotinib/prednisolona**

La combinación ruxolitinib más nilotinib está siendo estudiada para el tratamiento de la LMC y se ha encontrado que es una combinación eficaz para inhibir la fosforilación de JAK2, STAT5 y BCR/ABL e inducir la apoptosis de células CD34<sup>+</sup> (101). Además se encuentra actualmente en estudios clínicos fase I/II para LMC y leucemia linfoblástica aguda (LLA). En el caso de la presente tesis también se ha introducido la prednisolona, no sólo porque obtuvo buenos resultados en el cribado de fármacos, sino porque es un fármaco que habitualmente se usa en la práctica clínica para el control de los síntomas de la MF, además de que es capaz de inhibir la síntesis de TGF- $\beta$  (59), factor de crecimiento clave en los procesos fibróticos.

En todas las combinaciones estudiadas de ruxolitinib, nilotinib y prednisolona, se encontró un comportamiento sinérgico en pacientes de MF. Dos combinaciones en concreto presentaron una mediana de CI significativamente menor de uno. Una de ellas fue una combinación entre ruxolitinib y prednisolona y la otra era una triple combinación.

En las líneas celulares con la mutación JAK2 V617F se encontraron más combinaciones con comportamiento sinérgico que en el caso de la línea silvestre, fundamentalmente en las combinaciones compuestas por ruxolitinib y prednisolona, y en la triple combinación. Si añadimos que, al comparar directamente las líneas BA/F3 con mutación y sin ella, se pudo ver que hubo once combinaciones sinérgicas en la línea con la mutación y solo dos en la línea sin mutación, lo que parece indicar que la presencia de la mutación V617F en JAK2 y la hiperactivación de la ruta de señalización JAK/STAT tienen un papel fundamental en el establecimiento de sinergias entre los fármacos.

Las vías de señalización que principalmente se vieron afectadas por los fármacos y sus combinaciones fueron Akt/PI3K/mTOR, JAK/STAT y las quinasas de la familia SRC (Fyn, Hck, Yes, SRC), como era de esperar teniendo en cuenta los fármacos empleados.

La vía JAK/STAT se vio inhibida a los 30 minutos y se mantuvo a las 3 horas en presencia de ruxolitinib. En cambio, el nilotinib y la prednisolona provocaron un aumento de activación de dicha vía de señalización a los 30 minutos, probablemente como mecanismo compensatorio pero que se diluye en las combinaciones con ruxolitinib y con el tiempo de incubación.

La vía de ERK solamente se vio inhibida por el ruxolitinib en solitario tanto a 30 min, como a 3 horas. Por otro lado, parece hay un aumento de fosforilación de ERK en presencia de nilotinib y prednisolona, lo que parece ser un mecanismo compensatorio ya descrito con anterioridad en tumores prostáticos (102). Este mecanismo de compensación se logró dismantelar en las combinaciones debido a la presencia de ruxolitinib en SET2, pero no en BA/F3 JAK2 V617F.

La vía AKT empezó a inhibirse a las 3 horas por todos los tratamientos. En estudios con mayores tiempo de incubación o mayores concentraciones de nilotinib (103) o de ruxolitinib (104) se ha visto que ambos fármacos son capaces de inhibir la ruta.

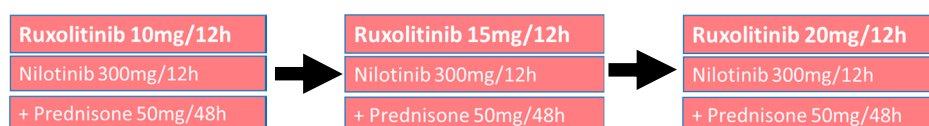
Las proteínas SRC se vieron inhibidas tanto por nilotinib como por ruxolitinib y sus combinaciones lo que va en la línea de estudios realizados por de Duan y colaboradores (105) o por Blake y colaboradores (96).

Por otro lado, las líneas sometidas a tratamientos duraderos con altas concentraciones de las combinaciones ruxolitinib/nilotinib y ruxolitinib/nilotinib/prednisolona parecen ser menos resistentes a ruxolitinib que aquellas que fueron sometidas a ruxolitinib en solitario. Por lo que se podría decir que el uso de estas combinaciones de fármacos dificulta la aparición de mecanismos de resistencia.

En definitiva, la combinación de ruxolitinib, nilotinib y prednisolona es efectiva porque los fármacos se complementan reduciendo los mecanismos compensatorios producidos en monoterapia y disminuyendo la aparición de resistencias, lo que podría redundar en disminuciones de la toxicidad, mayor eficacia y durabilidad de los tratamientos.

La característica que define a la MF es la aparición de fibras de reticulina en la médula ósea, lo que tiene un gran impacto en la fisiopatología de la enfermedad causando la movilización de progenitores y por tanto una eritropoyesis extramedular e ineficaz. El nilotinib es capaz de inhibir la expresión de colágeno I tanto a nivel de ARNm como de proteína, incluso en presencia de ruxolitinib y prednisolona que no tienen esta capacidad. Este hallazgo se ve respaldado por estudios realizados en otros tejidos como en piel (63)(64), hígado(65) y músculo (66).

De esta manera la combinación ruxolitinib/nilotinib/prednisolona se configura como una estrategia terapéutica frente a la MF que pretende aumentar el tiempo de aparición de resistencias a ruxolitinib sin perder su efectividad, y promover la disminución de la fibrosis en la médula ósea gracias al nilotinib en un ambiente menos pro-inflamatorio favorecido por el ruxolitinib (106) y en concreto por la prednisona, que ha demostrado disminuir la expresión de TGF- $\beta$  (59). Por estas razones y en base a nuestros resultados, se va a estudiar esta combinación en un ensayo clínico fase Ib/II en MF (figura 42). Este ensayo está en fase de aprobación por los diferentes comités éticos y se pretende empezar en Mayo de 2017 (Anexo II).



**Figura 42:** Esquema del ensayo fase Ib/II para el estudio de la combinación ruxolitinib/nilotinib/prednisona.



# **CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1.- El gen PRPF40B que codifica para un factor de *splicing* se encuentra mutado en un 22.2% de los pacientes estudiados. Por lo que uno de los mecanismos fisiopatogénicos de la MF parece estar relacionado con alteraciones del *splicing* del ARNm.

2.- Después del JAK2, los genes que presentaron una mayor frecuencia de mutación en MF fueron TET2 con un 37% de pacientes mutados y ASXL1, con un 33%, ambos relacionados con la regulación epigenética, por lo que puede ser otro de los mecanismos implicados en la fisiopatogenia de la enfermedad mielofibrótica. Además, la mutación en al menos uno de los genes relacionado con la regulación epigenética (TET2, ASXL1, EZH2 e IDH1/2) se encuentra fuertemente asociado con el diagnóstico de la MFP.

3.- Existe una tendencia en la disminución del tiempo de duración de la respuesta a ruxolitinib de los pacientes con al menos una mutación en los genes TET2, ASXL1, EZH2 e IDH1/2 con respecto a los que no lo presentan.

4.- El modelo de elección para el estudio *ex vivo* de la sensibilidad a ruxolitinib sería el modelo directo porque es el que mejor discrimina los respondedores y los respondedores de larga duración.

5.- El modelo de elección para el cribado de fármacos en la búsqueda de combinaciones con ruxolitinib para el tratamiento de la MF es el modelo de amplificación de células mieloides porque, además de conseguir el número suficiente de células para poder realizar el estudio, es uno de los que mejor disciernen los respondedores de larga duración.



6.- Las combinaciones de ruxolitinib con panobinostat, buparlisib, everolimus, nilotinib, bosutinib, ponatinib y prednisolona fueron las que consiguieron disminuir más el valor de su  $EC_{50}$ , convirtiéndolas en las mejores terapias combinadas encontradas en el cribado.

7.- La combinación ruxolitinib/nilotinib/prednisolona presentó un comportamiento sinérgico tanto en líneas celulares como en muestras de pacientes de MF.

8.- Las vías de señalización que principalmente se vieron afectadas por la combinación ruxolitinib/nilotinib/prednisolona fueron Akt/PI3K/mTOR, JAK/STAT y las quinasas de la familia SRC.

9.- Los mecanismos compensatorios y de activación de las vías de señalización de Akt, JAK/STAT, ERK o SRC de los fármacos en monoterapia se ven anulados en la combinación.

10.- El nilotinib es eficaz a la hora de inhibir la síntesis de colágeno I inducido por TGF- $\beta$  tanto en monoterapia como en la combinación ruxolitinib/nilotinib/prednisolona.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

1. Lucas GS, Padua RA, Masters GS, Oscier DG, Jacobs A. The application of X-chromosome gene probes to the diagnosis of myeloproliferative disease. *Br J Haematol*. 1989 Aug;72(4):530–3.
2. Bose P, Verstovsek S. Myelofibrosis: an update on drug therapy in 2016. *Expert Opin Pharmacother*. 2016 Dec 11;17(18):2375–89.
3. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016 May 19;127(20):2391–405.
4. Tefferi A, Thiele J, Orazi A, Kvasnicka HM, Barbui T, Hanson CA, et al. Proposals and rationale for revision of the World Health Organization diagnostic criteria for polycythemia vera, essential thrombocythemia, and primary myelofibrosis: Recommendations from an ad hoc international expert panel. *Blood*. 2007.
5. Cervantes F, Dupriez B, Pereira A, Passamonti F, Reilly JT, Morra E, et al. New prognostic scoring system for primary myelofibrosis based on a study of the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):2895–901.
6. Barosi G, Mesa RA, Thiele J, Cervantes F, Campbell PJ, Verstovsek S, et al. Proposed criteria for the diagnosis of post-polycythemia vera and post-essential thrombocythemia myelofibrosis: a consensus statement from the international working group for myelofibrosis research and treatment. *Leukemia*. 2008 Feb;22(2):437–8.
7. Passamonti F, Cervantes F, Vannucchi AM, Morra E, Rumi E, Pereira A, et al. A dynamic prognostic model to predict survival in primary myelofibrosis: a study by the IWG-MRT (International Working Group for Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment). *Blood*. 2010 Mar 4;115(9):1703–8.
8. Gangat N, Caramazza D, Vaidya R, George G, Begna K, Schwager S, et al. DIPSS plus: A refined dynamic international prognostic scoring system for primary myelofibrosis that incorporates prognostic information from karyotype, platelet count, and transfusion status. *J Clin Oncol*. 2011;29(4):392–7.
9. Caramazza D, Begna KH, Gangat N, Vaidya R, Siragusa S, Van Dyke DL, et al. Refined cytogenetic-risk categorization for overall and leukemia-free survival in primary myelofibrosis: a single center study of 433 patients. *Leukemia*. 2011 Jan;25(1):82–8.
10. Wojtaszewska M, Iwola M, Lewandowski K. Frequency and molecular characteristics of calreticulin gene (CALR) mutations in patients with JAK2 -negative myeloproliferative neoplasms. *Acta Haematol*. 2015;133(2):193–8.
11. Kiu H, Nicholson SE. Biology and significance of the JAK/STAT signalling pathways. *Growth Factors*. 2012 Apr;30(2):88–106.
12. Gäbler K, Behrmann I, Haan C. JAK2 mutants (e.g., JAK2V617F) and their importance as drug targets in myeloproliferative neoplasms. *JAK-STAT*. 2013 Jul 1;2(3):e25025.

13. Rinaldi CR, Rinaldi P, Alagia A, Gemei M, Esposito N, Formiggini F, et al. Preferential nuclear accumulation of JAK2V617F in CD34+ but not in granulocytic, megakaryocytic, or erythroid cells of patients with Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasia. *Blood*. 2010 Dec 23;116(26):6023–6.
14. Liu F, Zhao X, Perna F, Wang L, Koppikar P, Abdel-Wahab O, et al. JAK2V617F-mediated phosphorylation of PRMT5 downregulates its methyltransferase activity and promotes myeloproliferation. *Cancer Cell*. 2011 Feb 15;19(2):283–94.
15. Dawson M a, Bannister AJ, Göttgens B, Foster SD, Bartke T, Green AR, et al. JAK2 phosphorylates histone H3Y41 and excludes HP1alpha from chromatin. *Nature*. 2009 Oct 8;461(7265):819–22.
16. Griffiths DS, Li J, Dawson MA, Trotter MWB, Cheng Y, Smith AM, et al. LIF-independent JAK signalling to chromatin in embryonic stem cells uncovered from an adult stem cell disease. *Nat Cell Biol*. 2011 Jan 12;13(1):13–21.
17. Das S, Rachagani S, Torres-Gonzalez MP, Lakshmanan I, Majhi PD, Smith LM, et al. Carboxyl-terminal domain of MUC16 imparts tumorigenic and metastatic functions through nuclear translocation of JAK2 to pancreatic cancer cells. *Oncotarget*. 2015;6(8):5772–87.
18. Haan C, Kreis S, Margue C, Behrmann I. Jaks and cytokine receptors--an intimate relationship. *Biochem Pharmacol*. 2006 Nov 30;72(11):1538–46.
19. Lucet IS, Fantino E, Styles M, Bamert R, Patel O, Broughton SE, et al. The structural basis of Janus kinase 2 inhibition by a potent and specific pan-Janus kinase inhibitor. *Blood*. 2006 Jan 1;107(1):176–83.
20. Ungureanu D, Wu J, Pekkala T, Niranjana Y, Young C, Jensen ON, et al. The pseudokinase domain of JAK2 is a dual-specificity protein kinase that negatively regulates cytokine signaling. *Nat Struct Mol Biol*. 2011 Aug 14;18(9):971–6.
21. James C, Ugo V, Le Couédic J-P, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature*. 2005 Apr 28;434(7037):1144–8.
22. Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJP, et al. Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 2005 Apr;7(4):387–97.
23. Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet (London, England)*. 2005 Mar;365(9464):1054–61.
24. Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, et al. Identification of an acquired JAK2 mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem*. 2005 Jun 17;280(24):22788–92.
25. Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo S-S, Tiedt R, Passweg JR, et al. A gain-of-function mutation of JAK2 in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med*. 2005 Apr 28;352(17):1779–90.
26. Bandaranayake RM, Ungureanu D, Shan Y, Shaw DE, Silvennoinen O, Hubbard SR. Crystal structures of the JAK2 pseudokinase domain and the pathogenic mutant V617F. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Aug 22;19(8):754–9.

27. Ahn JS, Li J, Chen E, Kent DG, Park HJ, Green a R. JAK2V617F mediates resistance to DNA damage-induced apoptosis by modulating FOXO3A localization and Bcl-xL deamidation. *Oncogene*. 2016 Apr 28;35(17):2235–46.
28. Wang W-A, Groenendyk J, Michalak M. Calreticulin signaling in health and disease. *Int J Biochem Cell Biol*. 2012 Jun;44(6):842–6.
29. Clinton A, McMullin MF. The Calreticulin gene and myeloproliferative neoplasms. *J Clin Pathol*. 2016 Oct;69(10):841–5.
30. Nakamura K, Zuppin A, Arnaudeau S, Lynch J, Ahsan I, Krause R, et al. Functional specialization of calreticulin domains. *J Cell Biol*. 2001 Sep 3;154(5):961–72.
31. Kepp O, Menger L, Vacchelli E, Locher C, Adjemian S, Yamazaki T, et al. Crosstalk between ER stress and immunogenic cell death. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2013 Aug;24(4):311–8.
32. Klampfl T, Gisslinger H, Harutyunyan AS, Nivarthi H, Rumi E, Milosevic JD, et al. Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2379–90.
33. Ha J-S, Kim Y-K. Calreticulin exon 9 mutations in myeloproliferative neoplasms. *Ann Lab Med*. 2015 Jan;35(1):22–7.
34. Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, et al. Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med*. 2013 Dec 19;369(25):2391–405.
35. Marty C, Pecquet C, Nivarthi H, El-Khoury M, Chachoua I, Tulliez M, et al. Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis. *Blood*. 2016 Mar 10;127(10):1317–24.
36. Chachoua I, Pecquet C, El-Khoury M, Nivarthi H, Albu R-I, Marty C, et al. Thrombopoietin receptor activation by myeloproliferative neoplasm associated calreticulin mutants. *Blood*. 2016 Mar 10;127(10):1325–35.
37. Vainchenker W, Kralovics R. Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms. *Blood*. 2017 Feb 9;129(6):667–79.
38. Ma W, Zhang X, Wang X, Zhang Z, Yeh C-H, Uyeji J, et al. MPL mutation profile in JAK2 mutation-negative patients with myeloproliferative disorders. *Diagn Mol Pathol*. 2011 Mar;20(1):34–9.
39. Nangalia J, Green TR. The evolving genomic landscape of myeloproliferative neoplasms. *Hematol Am Soc Hematol Educ Progr*. 2014 Dec 5;2014(1):287–96.
40. Xu W, Yang H, Liu Y, Yang Y, Wang P, Kim S-H, et al. Oncometabolite 2-hydroxyglutarate is a competitive inhibitor of  $\alpha$ -ketoglutarate-dependent dioxygenases. *Cancer Cell*. 2011 Jan 18;19(1):17–30.
41. Pardanani A, Lasho TL, Finke CM, Mai M, McClure RF, Tefferi A. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic- and blast-phase myeloproliferative neoplasms. *Leukemia*. 2010 Jun;24(6):1146–51. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20410924>
42. Lee J, Solomon DA, Tihan T. The role of histone modifications and telomere alterations

- in the pathogenesis of diffuse gliomas in adults and children. *J Neurooncol.* 2017 Mar 7;132(1):1–11.
43. Saeidi K. Myeloproliferative neoplasms: Current molecular biology and genetics. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2016 Feb;98(2016):375–89.
44. Swaminathan G, Tsygankov AY. The Cbl family proteins: ring leaders in regulation of cell signaling. *J Cell Physiol.* 2006 Oct;209(1):21–43.
45. Tabarrokhi A, Tiu R V. Molecular genetics of myelofibrosis and its associated disease phenotypes. *Transl Med @ UniSa.* 2014 Jan;8(7):53–64.
46. Lataillade J-J, Pierre-Louis O, Hasselbalch HC, Uzan G, Jasmin C, Martyré M-C, et al. Does primary myelofibrosis involve a defective stem cell niche? From concept to evidence. *Blood.* 2008 Oct 15;112(8):3026–35.
47. Castro-Malaspina H, Rabellino EM, Yen A, Nachman RL, Moore MA. Human megakaryocyte stimulation of proliferation of bone marrow fibroblasts. *Blood.* 1981 Apr;57(4):781–7.
48. Barosi G, Hoffman R. Idiopathic Myelofibrosis. *Semin Hematol.* 2005 Oct;42(4):248–58.
49. Martyré MC, Romquin N, Le Bousse-Kerdiles MC, Chevillard S, Benyahia B, Dupriez B, et al. Transforming growth factor-beta and megakaryocytes in the pathogenesis of idiopathic myelofibrosis. *Br J Haematol.* 1994 Sep;88(1):9–16. Available from:
50. Martyré MC. Platelet PDGF and TGF- $\beta$  Levels in Myeloproliferative Disorders. *Leuk Lymphoma.* 1991;6(1):1–6. Available from:
51. Han Y, Yue L, Wei M, Ren X, Shao Z, Zhang L, et al. Mesenchymal Cell Reprogramming in Experimental MPLW515L Mouse Model of Myelofibrosis. *PLoS One.* 2017;12(1):e0166014.
52. Emadi S, Clay D, Desterke C, Guerton B, Maquarre E, Charpentier A, et al. IL-8 and its CXCR1 and CXCR2 receptors participate in the control of megakaryocytic proliferation, differentiation, and ploidy in myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Blood.* 2005 Jan 15;105(2):464–73.
53. Singh A, Xu Y. The Cell Killing Mechanisms of Hydroxyurea. *Genes (Basel).* 2016 Nov 17;7(11):E99.
54. Kiladjian J, Mesa RA, Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood.* 2011 May 5;117(18):4706–15.
55. Silver RT, Vandris K, Goldman JJ. Recombinant interferon- $\alpha$  may retard progression of early primary myelofibrosis: a preliminary report. *Blood.* 2011 Jun 16;117(24):6669–72.
56. Tefferi A. How I treat myelofibrosis. *Blood.* 2011 Mar 31;117(13):3494–504.
57. Engelhardt M, Wäsch R, Reinhardt H, Kleber M. Pomalidomide. *Recent Results Cancer Res.* 2014;201:359–72.
58. Hernández-Boluda J-C, Martínez-Trillos A, García-Gutiérrez V, Ferrer-Marín F, Xicoy B, Alvarez-Larrán A, et al. Long-term results of prednisone treatment for the anemia of myelofibrosis. *Leuk Lymphoma.* 2016;57(1):120–4.

59. Yu W, Guo F, Song X. Effects and mechanisms of pirfenidone, prednisone and acetylcysteine on pulmonary fibrosis in rat idiopathic pulmonary fibrosis models. *Pharm Biol.* 2017 Dec;55(1):450–5.
60. Cervantes F, Vannucchi AM, Kiladjian J-J, Al-Ali HK, Sirulnik A, Stalbovskaya V, et al. Three-year efficacy, safety, and survival findings from COMFORT-II, a phase 3 study comparing ruxolitinib with best available therapy for myelofibrosis. *Blood.* 2013 Dec 12;122(25):4047–53.
61. Vannucchi AM, Harrison CN. Emerging treatments for classical myeloproliferative neoplasms. *Blood.* 2017 Feb 9;129(6):693–703.
62. Gudernova I, Foldynova-Trantirkova S, Ghannamova B El, Fafilek B, Varecha M, Balek L, et al. One reporter for in-cell activity profiling of majority of protein kinase oncogenes. *Elife.* 2017 Feb 15;6:e21536.
63. Luchetti MM, Moroncini G, Jose Escamez M, Svegliati Baroni S, Spadoni T, Grieco A, et al. Induction of Scleroderma Fibrosis in Skin-Humanized Mice by Administration of Anti-Platelet-Derived Growth Factor Receptor Agonistic Autoantibodies. *Arthritis Rheumatol (Hoboken, NJ).* 2016 Sep;68(9):2263–73.
64. Akhmetshina A, Dees C, Pileckyte M, Maurer B, Axmann R, Jüngel A, et al. Dual inhibition of c-abl and PDGF receptor signaling by dasatinib and nilotinib for the treatment of dermal fibrosis. *FASEB J.* 2008 Jul 28;22(7):2214–22.
65. Liu Y, Wang Z, Kwong SQ, Lui ELH, Friedman SL, Li FR, et al. Inhibition of PDGF, TGF- $\beta$ , and Abl signaling and reduction of liver fibrosis by the small molecule Bcr-Abl tyrosine kinase antagonist Nilotinib. *J Hepatol.* 2011 Sep;55(3):612–25.
66. Lemos DR, Babaeijandaghi F, Low M, Chang C, Lee ST, Fiore D, et al. Nilotinib reduces muscle fibrosis in chronic muscle injury by promoting TNF-mediated apoptosis of fibro/adipogenic progenitors. *Nat Med.* 2015 Jul;21(7):786–94.
67. Koh RY, Lim CL, Uhal BD, Abdullah M, Vidyadaran S, Ho CC, et al. Inhibition of transforming growth factor- $\beta$  via the activin receptor-like kinase-5 inhibitor attenuates pulmonary fibrosis. *Mol Med Rep.* 2015 May 13;11(5):3808–13.
68. Kaplan GS, Torcun CC, Grune T, Ozer NK, Karademir B. Proteasome inhibitors in cancer therapy: Treatment regimen and peripheral neuropathy as a side effect. *Free Radic Biol Med.* 2017 Feb;103(July 2016):1–13.
69. Wagner-Ballon O, Pisani DF, Gastinne T, Tulliez M, Chaligné R, Lacout C, et al. Proteasome inhibitor bortezomib impairs both myelofibrosis and osteosclerosis induced by high thrombopoietin levels in mice. *Blood.* 2007 Jul 1;110(1):345–53.
70. Sevin M, Girodon F, Garrido C, Thonel A De. HSP90 and HSP70 : Implication in Inflammation Processes and Therapeutic Approaches for Myeloproliferative Neoplasms. 2015;2015.
71. Wang Y, Fiskus W, Chong DG, Buckley KM, Natarajan K, Rao R, et al. Cotreatment with panobinostat and JAK2 inhibitor TG101209 attenuates JAK2V617F levels and signaling and exerts synergistic cytotoxic effects against human myeloproliferative neoplastic cells. *Blood.* 2009 Dec 3;114(24):5024–33.
72. Bar-Natan M, Nelson EA, Walker SR, Kuang Y, Distel RJ, Frank DA. Dual inhibition of Jak2



- and STAT5 enhances killing of myeloproliferative neoplasia cells. *Leukemia*. 2012 Jun;26(6):1407–10.
73. Tefferi A, Cervantes F, Mesa R, Passamonti F, Verstovsek S, Vannucchi AM, et al. Revised response criteria for myelofibrosis: International Working Group-Myeloproliferative Neoplasms Research and Treatment (IWG-MRT) and European LeukemiaNet (ELN) consensus report. *Blood*. 2013 Aug 22;122(8):1395–8.
74. Chou TC. Derivation and properties of Michaelis-Menten type and Hill type equations for reference ligands. *J Theor Biol*. 1976 Jul 7;59(2):253–76.
75. Chou T-C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev*. 2006 Sep;58(3):621–81.
76. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001 May 1;29(9):e45.
77. Wiza C, Nascimento EBM, Ouwens DM. Role of PRAS40 in Akt and mTOR signaling in health and disease. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2012 Jun 15;302(12):E1453-60.
78. Delic S, Rose D, Kern W, Nadarajah N, Haferlach C, Haferlach T, et al. Application of an NGS-based 28-gene panel in myeloproliferative neoplasms reveals distinct mutation patterns in essential thrombocythaemia, primary myelofibrosis and polycythaemia vera. *Br J Haematol*. 2016 Nov;175(3):419–26.
79. Agarwal R, Blombery P, McBean M, Jones K, Fellowes A, Doig K, et al. Clinicopathological differences exist between CALR- and JAK2-mutated myeloproliferative neoplasms despite a similar molecular landscape: data from targeted next-generation sequencing in the diagnostic laboratory. *Ann Hematol*. 2017 May 4;96(5):725–32.
80. Nakajima H, Kunimoto H. TET2 as an epigenetic master regulator for normal and malignant hematopoiesis. *Cancer Sci*. 2014 Sep;105(9):1093–9.
81. Zhang X, Su J, Jeong M, Ko M, Huang Y, Park HJ, et al. DNMT3A and TET2 compete and cooperate to repress lineage-specific transcription factors in hematopoietic stem cells. *Nat Genet*. 2016 Sep;48(9):1014–23.
82. Patel KP, Newberry KJ, Luthra R, Jabbour E, Pierce S, Cortes J, et al. Correlation of mutation profile and response in patients with myelofibrosis treated with ruxolitinib. *Blood*. 2015 Aug 6;126(6):790–7.
83. Yonal-Hindilerden I, Daglar-Aday A, Hindilerden F, Akadam-Teker B, Yilmaz C, Nalcaci M, et al. The Clinical Significance of IDH Mutations in Essential Thrombocythemia and Primary Myelofibrosis. *J Clin Med Res*. 2016 Jan;8(1):29–39.
84. Becerra S, Montes M, Hernández-Munain C, Suñé C. Prp40 pre-mRNA processing factor 40 homolog B (PRPF40B) associates with SF1 and U2AF65 and modulates alternative pre-mRNA splicing in vivo. *RNA*. 2015 Mar;21(3):438–57.
85. Barosi G, Gattoni E, Guglielmelli P, Campanelli R, Facchetti F, Fisogni S, et al. Phase I/II study of single-agent bortezomib for the treatment of patients with myelofibrosis. Clinical and biological effects of proteasome inhibition. *Am J Hematol*. 2010 Aug;85(8):616–9.

86. Mascarenhas J. Rationale for combination therapy in myelofibrosis. *Best Pract Res Clin Haematol*. 2014 Jun;27(2):197–208.
87. Evrot E, Ebel N, Romanet V, Roelli C, Andraos R, Qian Z, et al. JAK1/2 and Pan-deacetylase inhibitor combination therapy yields improved efficacy in preclinical mouse models of JAK2V617F-driven disease. *Clin Cancer Res*. 2013 Nov 15;19(22):6230–41.
88. Mascarenhas J, Sandy L, Lu M, Yoon J, Petersen B, Zhang D, et al. A phase II study of panobinostat in patients with primary myelofibrosis (PMF) and post-polycythemia vera/essential thrombocythemia myelofibrosis (post-PV/ET MF). *Leuk Res*. 2017 Feb;53:13–9.
89. DeAngelo DJ, Mesa RA, Fiskus W, Tefferi A, Paley C, Wadleigh M, et al. Phase II trial of panobinostat, an oral pan-deacetylase inhibitor in patients with primary myelofibrosis, post-essential thrombocythaemia, and post-polycythaemia vera myelofibrosis. *Br J Haematol*. 2013 Aug;162(3):326–35.
90. Menezes DL, Taverna P, Jensen MR, Abrams T, Stuart D, Yu GK, et al. The novel oral Hsp90 inhibitor NVP-HSP990 exhibits potent and broad-spectrum antitumor activities in vitro and in vivo. *Mol Cancer Ther*. 2012 Mar;11(3):730–9.
91. Marubayashi S, Koppikar P, Taldone T, Abdel-Wahab O, West N, Bhagwat N, et al. HSP90 is a therapeutic target in JAK2-dependent myeloproliferative neoplasms in mice and humans. *J Clin Invest*. 2010 Oct 1;120(10):3578–93.
92. Fiskus W, Verstovsek S, Manshouri T, Rao R, Balusu R, Venkannagari S, et al. Heat shock protein 90 inhibitor is synergistic with JAK2 inhibitor and overcomes resistance to JAK2-TKI in human myeloproliferative neoplasm cells. *Clin Cancer Res*. 2011 Dec 1;17(23):7347–58.
93. Ugo V, Marzac C, Teyssandier I, Larbret F, Lécluse Y, Debili N, et al. Multiple signaling pathways are involved in erythropoietin-independent differentiation of erythroid progenitors in polycythemia vera. *Exp Hematol*. 2004 Feb;32(2):179–87.
94. Bogani C, Bartalucci N, Martinelli S, Tozzi L, Guglielmelli P, Bosi A, et al. mTOR inhibitors alone and in combination with JAK2 inhibitors effectively inhibit cells of myeloproliferative neoplasms. Tse W, editor. *PLoS One*. 2013 Jan 31;8(1):e54826.
95. Barrio S, Gallardo M, Arenas A, Ayala R, Rapado I, Rueda D, et al. Inhibition of related JAK/STAT pathways with molecular targeted drugs shows strong synergy with ruxolitinib in chronic myeloproliferative neoplasm. *Br J Haematol*. 2013 Jun;161(5):667–76.
96. Blake SJ, Lyons AB, Hughes TP. Nilotinib inhibits the Src-family kinase LCK and T-cell function in vitro. *J Cell Mol Med*. 2009 Mar;13(3):599–601.
97. Green MR, Newton MD, Fancher KM. Off-Target Effects of BCR-ABL and JAK2 Inhibitors. *Am J Clin Oncol*. 2016 Feb;39(1):76–84.
98. Poch Martell M, Sibai H, Deotare U, Lipton JH. Ponatinib in the therapy of chronic myeloid leukemia. *Expert Rev Hematol*. 2016 Oct;9(10):923–32.
99. Deshpande S, Bosbach B, Yozgat Y, Park CY, Moore MAS, Besmer P. KIT receptor gain-of-function in hematopoiesis enhances stem cell self-renewal and promotes progenitor cell expansion. *Stem Cells*. 2013 Aug;31(8):1683–95.

100. Rojas-Sutterlin S, Lecuyer E, Hoang T. Kit and Scl regulation of hematopoietic stem cells. *Curr Opin Hematol*. 2014 Jul;21(4):256–64.
101. Gallipoli P, Cook A, Rhodes S, Hopcroft L, Wheadon H, Whetton AD, et al. JAK2/STAT5 inhibition by nilotinib with ruxolitinib contributes to the elimination of CML CD34+ cells in vitro and in vivo. *Blood*. 2014 Aug 28;124(9):1492–501.
102. Schneider M, Korzeniewski N, Merkle K, Schöler J, Gröllich C, Hadaschik B, et al. The tyrosine kinase inhibitor nilotinib has antineoplastic activity in prostate cancer cells but up-regulates the ERK survival signal-Implications for targeted therapies. *Urol Oncol*. 2015 Feb;33(2):72.e1-7.
103. Au K, Singh SK, Burrell K, Sabha N, Hawkins C, Huang A, et al. A preclinical study demonstrating the efficacy of nilotinib in inhibiting the growth of pediatric high-grade glioma. *J Neurooncol*. 2015 May 4;122(3):471–80.
104. Chase A, Bryant C, Score J, Haferlach C, Grossmann V, Schwaab J, et al. Ruxolitinib as potential targeted therapy for patients with JAK2 rearrangements. *Haematologica*. 2013 Mar;98(3):404–8.
105. Duan Y, Chen L, Chen Y, Fan X. c-Src binds to the cancer drug Ruxolitinib with an active conformation. Xu W, editor. *PLoS One*. 2014 Sep 8;9(9):e106225. 106. Mascarenhas J, Hoffman R. A comprehensive review and analysis of the effect of ruxolitinib therapy on the survival of patients with myelofibrosis. *Blood*. 2013 Jun 13;121(24):4832–7.

**ANEXOS**



## ANEXO I: VARIANTES ENCONTRADAS POR NGS

Cr.	Exón	Gen	Tránsito	Secuencia DNA	Secuencia aa
2	3	DNMT3A	NM_022552.4	c.89A>C	p.Glu30Ala
2	4	IDH1	NM_005896.3	c.395G>A	p.Arg132His
2	6	IDH1	NM_005896.3	c.548A>G	p.Tyr183Cys
2	7	TPO	NM_000547.5	c.674G>A	p.Arg225His
2	14	SF3B1	NM_012433.2	c.1998G>C	p.Lys666Asn
4	3	TET2	NM_001127208.2	c.1443_1443delG	p.Asn482fs
4	3	TET2	NM_001127208.2	c.2474C>G	p.Ser825Ter
4	3	TET2	NM_001127208.2	c.2710C>T	p.Gln904Ter
4	3	TET2	NM_001127208.2	c.3035C>T	p.Pro1012Leu
4	3	TET2	NM_001127208.2	c.3088C>T	p.Gln1030Ter
4	3	TET2	NM_001127208.2	c.3404G>A	p.Cys1135Tyr
4	3	TET2	NM_001127208.2	c.521C>A	p.Pro174His
4	3	TET2	NM_001127208.2	c.822_822delC	p.Asn275fs
4	4	TET2	NM_001127208.2	c.3477_3478delTA	p.Ile1160fs
4	5	TET2	NM_001127208.2	c.3505G>A	p.Gly1169Arg
4	5	TET2	NM_001127208.2		
4	6	TET2	NM_001127208.2	c.3739G>T	p.Glu1247Ter
4	11	TET2	NM_001127208.2	c.5103G>A	p.Met1701Ile
4	11	TET2	NM_001127208.2	c.5541G>A	p.Trp1847Ter
7	4	EZH2	NM_004456.4		
7	8	EZH2	NM_004456.4	c.881G>A	p.Cys294Tyr
7	14	EZH2	NM_004456.4	c.1655G>A	p.Cys552Tyr
7	15	EZH2	NM_004456.4	c.1817G>T	p.Cys606Phe
7	16	EZH2	NM_004456.4		
7	17	EZH2	NM_004456.4	c.2024A>T	p.Asn675Ile
9	14	JAK2	NM_004972.3	c.1849G>T	p.Val617Phe
11	8	CBL	NM_005188.3	c.1141T>C	p.Cys381Arg
11	8	CBL	NM_005188.3		
11	9	CBL	NM_005188.3	c.1259G>A	p.Arg420Gln
11	14	JAK2	NM_005188.3	c.1849G>T	p.Val617Phe
11	27	KMT2A	NM_001197104.1	c.6884G>A	p.Ser2295Asn
12	3	PRPF40B	NM_001031698.2	c.128T>C	p.Leu43Pro
12	7	SH2B3	NM_005475.2	c.1255A>C	p.Thr419Pro
12	8	SH2B3	NM_005475.2	c.1696C>T	p.Arg566Trp
12	20 26	PRPF40B	NM_001031698.2 NM_175736.4	c.1931A>C	p.Glu644Ala
12	23 26	PRPF40B	NM_001031698.2 NM_175736.4		
12	23 26	PRPF40B	NM_001031698.2 NM_175736.4		
12	23 26	PRPF40B	NM_001031698.2 NM_175736.4		
12	23 26	PRPF40B	NM_001031698.2 NM_175736.4		
15	4	IDH2	NM_002168.2	c.419G>A	p.Arg140Gln
15	11	IDH2	NM_002168.2	c.1304C>T	p.Thr435Met
17	5	TP53	NM_000546.5	c.490A>G	p.Lys164Glu
19	9	CALR	NM_004343.3	c.1092_1143delGCAGAGGCTTAAGGAGGA GGAAGAAGACAAGAAACGC AAAGAGGAGGAGGAG	p.Leu367fs*54
19	9	CALR	NM_004343.3	c.1154_1155insTTGTC	p.Lys385fs*5
19	9	CALR	NM_004343.3	c.1154_1155insTTGTC	p.Lys385fs*5
19	9	CALR	NM_004343.3		p.Glu372fs*34

Cr.	Exón	Gen	Tránsito	Secuencia DNA	Secuencia aa
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.1777_1778delAT	p.Cys594fs
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.2455G>A	p.Gly819Arg
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.2476G>T	p.Gly826Ter
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.2597T>G	p.Leu866Ter
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.2687T>A	p.Leu896Ter
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.2983_2984insA	p.His995fs
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.3306G>T	p.Glu1102Asp
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.3403C>T	p.Gln1135Ter
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.3889G>A	p.Val1297Ile
20	12	ASXL1	NM_015338.5	c.4189G>A	p.Gly1397Ser
21	5	RUNX1	NM_001754.4	c.377A>T	p.Asp126Val
21	6	U2AF1	NM_006758.2	c.470A>C	p.Gln157Pro
21	6	U2AF1	NM_006758.2	c.470A>G	p.Gln157Arg
X	9	ATRX	NM_000489.4	c.2595C>G	p.His865Gln
X	10	ZRSR2	NM_005089.3	c.839G>A	p.Cys280Tyr
X	11	ZRSR2	NM_005089.3	c.1143_1143delA	p.Asn382fs
X	11	ZRSR2	NM_005089.3	c.1199_1199delG	p.Ser400fs

**ANEXO II: ENSAYO CLÍNICO RuNiC**

---

**Clinical trial protocol****“Phase Ib/II clinical trial of ruxolitinib in combination with nilotinib and prednisone for myelofibrosis: RuNiC study”**

Protocol code: RuNiC  
EudraCT number: 2016-005214-21  
Protocol version: 1.0, 22 Dec 2016

**Sponsor:**

Spanish Group of Philadelphia-Negative Chronic Myeloproliferative Diseases (*Grupo Español de Enfermedades Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas*, GEMFIN)  
Carrer del Secretari Coloma, 64-68, 08024 Barcelona (Spain)

**Coordinating investigator:**

Dr. Joaquín Martínez-López.  
Department of Hematology and Hemotherapy.  
Hospital Universitario 12 de Octubre.  
Avenida de Córdoba, S/N, 28041 Madrid (Spain).

**Confidentiality**

The information contained in this document is the property of the sponsor and is therefore provided to you confidentially for review by yourself, your research team, the ethics committee and the competent authorities. The information contained herein will not be disclosed to others without prior written authorization from the sponsor, except to the extent necessary to obtain informed consent from those persons who participate in the study



## Protocol summary

<b>Sponsor</b>	Spanish Group of Philadelphia-Negative Chronic Myeloproliferative Diseases ( <i>Grupo Español de Enfermedades Mieloproliferativas Crónicas Filadelfia Negativas</i> , GEMFIN).
<b>Title of Study</b>	Phase Ib/II clinical trial of ruxolitinib in combination with nilotinib and prednisone for myelofibrosis (RuNiC study).
<b>Phase Development of</b>	Ib/II.
<b>Protocol Code</b>	RuNiC.
<b>EudraCT Number</b>	2016-005214-21.
<b>Protocol Version</b>	1.0, 22 Dec 2016.
<b>Coordinating Investigator</b>	Joaquín Martínez-López (Hospital Universitario 12 de Octubre, Spain).
<b>Number of Centers Planned</b>	8 centers in Spain.
<b>Primary Objective</b>	The primary objective of the study is to determine the maximum tolerated dose (MTD) and the recommended phase III dose (RP3D) of ruxolitinib when administered in combination with nilotinib 300mg twice a day (BID) and prednisone 50mg every other day (EOD).
<b>Secondary Objectives</b>	<p>The secondary objectives of the study are the follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ To evaluate the safety profile of ruxolitinib, nilotinib and prednisone administered in combination.</li> <li>▪ To evaluate the clinical activity of ruxolitinib, nilotinib and prednisone administered in combination.</li> </ul>
<b>Investigational product</b>	Ruxolitinib in increasing doses administered in combination with nilotinib and prednisone.
<b>Rationale for the Study</b>	<p>Finding the best therapy option to treat myelofibrosis (MF) represents a huge challenge. Ruxolitinib is a potent JAK1/2 inhibitor that has demonstrated improved survival and symptomatology in MF patients. There are a lot researches looking for the best combination of JAK inhibitor to improve its efficacy<sup>1</sup>. A previous work screened different drugs to evaluate if they were synergistic with ruxolitinib and founded that ruxolitinib was synergistic with nilotinib and prednisolone as well as other drugs including bortezomib and HSP-90 inhibitors.</p> <p>As done by Bennet et al. in AML<sup>2</sup>, it has been identified in an <i>ex-vivo</i> model based in flow cytometry the most synergistic drugs with ruxolitinib in cellular lines and primary samples from chronic myeloproliferative neoplasm patients. Ruxolitinib has been studied plus 30 drugs whose mechanism of action is implicated in proliferation, differentiation and survival, cell-cycle inhibitor, un-fold protein process, epigenetic, immune response or simply used in chronic myeloproliferative neoplasm patients with primary or secondary MF. A recent work of Gallipoli et al.<sup>3</sup> demonstrated that the combination of ruxolitinib and nilotinib works well together in chronic myelogenous leukemia. Moreover, nilotinib seems to have an anti-fibrotic effect in liver<sup>4-6</sup> and in lung<sup>7</sup>, a desirable effect for treatment of MF.</p> <p>The more synergistic combinations that have been founded with ruxolitinib are BKM120 (ongoing), everolimus and EDE225 (ongoing), bortezomib, nilotinib and prednisone. Arenas et al.<sup>8</sup> focused on the triple combination of ruxolitinib, nilotinib, and prednisone to study the synergistic behavior and mechanism of actions of this triple combination both in MF patient samples and cell lines. In patients samples, a synergistic behavior (<math>C&lt;1</math>) in all combination in most of the patients were founded, the triple combination being the strongly synergetic in all patient samples: <math>CI=0.213</math> and <math>0.348</math>. In pathologic cells, there was not a synergistic interaction between ruxolitinib and nilotinib or prednisone because ruxolitinib didn't result efficient enough in this model.</p> <p>These results of a synergistic effect of ruxolitinib when combined with nilotinib and prednisone in MF patient samples, in part mediated through a greatest inhibition</p>

	of STAT5 and AKT pathways, lead the authors conclude that these preclinical data warrant a clinical trial with this combination in patients with MF.
<b>General Design and Methodology</b>	<p>This is a phase Ib/II, two arms, open-label and dose-escalation study designed to determine the MTD and the RP3D of ruxolitinib when administered in combination with nilotinib 300 mg BID and prednisone 50 mg EOD in patients with MF.</p> <p>The study will consist of <b>two arms</b>:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u>Arm A</u>: patients naïve to JAK inhibitors treatment.</li> <li>▪ <u>Arm B</u>: patients non-responding to or relapsed after JAK inhibitors treatment.</li> </ul> <p>The study design comprises <b>two study phases</b> for both arms: a dose-escalation phase followed by a dose-expansion phase.</p> <p><b>Dose Escalation Phase</b> with 3 potential dose levels (or cohorts):</p> <p>During the dose escalation phase, three dose levels of ruxolitinib ranging from 10 mg BID to 20 mg BID will be evaluated in combination with nilotinib and prednisone as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ <u>Dose level 1</u>: ruxolitinib 10mg BID, nilotinib 300mg BID, prednisone 50mg EOD.</li> <li>▪ <u>Dose level 2</u>: ruxolitinib 15mg BID, nilotinib 300mg BID, prednisone 50mg EOD.</li> <li>▪ <u>Dose level 3</u>: ruxolitinib 20mg BID, nilotinib 300mg BID, prednisone 50mg EOD.</li> </ul> <p>In the dose-escalation phase, the MTD of the combination treatment will be based upon the estimation of DLT in cycle 1 for patients in the dose-determining set. This will be estimated by the following classic (non-Bayesian) model. Dose escalation will follow the procedures below:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ The first dose level will include 3 patients. If no DLT is exhibited in 3 evaluable patients during the first cycle, the next cohort will begin at the next dose level.</li> <li>▪ If a DLT is faced among these 3 patients during the first cycle, 3 more patients will be included in the same dose level.</li> <li>▪ If a DLT is no longer faced among these 6 patients during the first cycle, the recruitment will continue at the next dose level.</li> <li>▪ If more than a DLT is faced among these 6 patients during the first cycle, the following patients will be included at a lower dose level (-1), until a total of 6 evaluable patients are treated with the MTD.</li> </ul> <p>If DLTs appear in 2 or more patients at any dose level, it will be assumed that the MTD is exceeded and no more patients will be recruited at this dose level; patients already included at this dose level will not be treated with additional doses of study treatment.</p> <p>If two or more DLTs appear in the lowest dose level (-1), the study treatment will end.</p> <p><b>Dose-Expansion Phase</b> after determination of the MTD:</p> <p>In the dose-expansion phase, an additional 10 patients in each arm (20 patients in total) to those treated at the MTD during dose-escalation phase will be treated at the respective MTD for their respective arm.</p>

<b>Study and Regimen</b>	<b>Treatment Dosing</b>																				
	<p>As mentioned, the study treatment is the combination of ruxolitinib with nilotinib and prednisone. Initial doses and treatment schedule are described in the table below. The dose escalation phase initially planned with ruxolitinib starting from 10 mg BID is based on phase II studies that have shown this dose as the lowest dose effective. The starting dose of nilotinib is the standard dose used in the treatment of chronic myeloid leukemia. The dose of 50 mg for prednisone was based on the use of long-term corticoids therapy in other hematological malignancies.</p> <p><b>Table. Dosing regimen</b></p> <table><tr><th>Study treatments</th><th>Pharmaceutical form and route of administration</th><th>Dose</th><th>Frequency and/or regimen</th></tr><tr><td>Ruxolitinib</td><td>Tablets for oral administration</td><td>Starting dose 10 mg to be increased or decreased per a classic (non-Bayesian) model</td><td>Twice a day in 28-day treatment cycles</td></tr><tr><td>Nilotinib</td><td>Capsules for oral administration</td><td>Starting dose of 300 mg to be maintained during the treatment period</td><td>Twice a day in 28-day treatment cycles</td></tr><tr><td>Prednisone</td><td>Tablets for oral administration</td><td>Starting dose of 50 mg to be maintained during the treatment period</td><td>Every other day in 28-day treatment cycles.</td></tr></table>	Study treatments	Pharmaceutical form and route of administration	Dose	Frequency and/or regimen	Ruxolitinib	Tablets for oral administration	Starting dose 10 mg to be increased or decreased per a classic (non-Bayesian) model	Twice a day in 28-day treatment cycles	Nilotinib	Capsules for oral administration	Starting dose of 300 mg to be maintained during the treatment period	Twice a day in 28-day treatment cycles	Prednisone	Tablets for oral administration	Starting dose of 50 mg to be maintained during the treatment period	Every other day in 28-day treatment cycles.				
Study treatments	Pharmaceutical form and route of administration	Dose	Frequency and/or regimen																		
Ruxolitinib	Tablets for oral administration	Starting dose 10 mg to be increased or decreased per a classic (non-Bayesian) model	Twice a day in 28-day treatment cycles																		
Nilotinib	Capsules for oral administration	Starting dose of 300 mg to be maintained during the treatment period	Twice a day in 28-day treatment cycles																		
Prednisone	Tablets for oral administration	Starting dose of 50 mg to be maintained during the treatment period	Every other day in 28-day treatment cycles.																		
<b>Dose Escalation and Determination of MTD</b>	<p>A classic (non-Bayesian) model will guide the ruxolitinib dose escalation in the dose-escalation phase of the study.</p> <p>For the purposes of dose escalation decisions, the dose levels of ruxolitinib escribed below will be evaluated in combination with nilotinib and prednisone. Doses of nilotinib (300 mg BID) and prednisone (50 mg EOD) will be maintained during the trial. This study does not contemplate a reduction in doses of nilotinib and prednisone except in cases of toxicities. In such cases, doses of nilotinib and prednisone will be reduced to 200 mg BID and 25 mg EOD, respectively.</p> <p><b>Table. Dose levels of ruxolitinib by cohort</b></p> <table><tr><th>Dose level</th><th>Proposed dose</th><th>Change from previous dose</th><th>No of patients</th></tr><tr><td>-1*</td><td>Ruxolitinib 5 mg BID</td><td>-50%</td><td></td></tr><tr><td>1</td><td><b>Ruxolitinib 10 mg BID</b></td><td><b>Starting dose</b></td><td><b>3</b></td></tr><tr><td>2</td><td>Ruxolitinib 15 BID</td><td>+50%</td><td>3</td></tr><tr><td>3</td><td>Ruxolitinib 20 mg BID</td><td>+33%</td><td>3</td></tr></table> <p><i>*Dose level -1 represents treatment dose in case of patients requiring a dose reduction from the starting dose level. No dose reduction below dose level -1 is permitted for this study.</i></p> <p>Patients must complete a minimum of 1 cycle of treatment with the minimum safety evaluation and drug exposure or have experienced a DLT within the first cycle of treatment to be considered evaluable for dose-escalation decisions. The MTD of the combination treatment will be based upon the estimation of DLT in cycle 1 for patients in the dose-determining set. Dose escalation will follow the procedures below:</p> <ul style="list-style-type: none"><li>▪ The first dose level will include 3 patients. If no DLT is exhibited in 3 evaluable patients during the first cycle, the next cohort will begin at the next dose level.</li><li>▪ If a DLT is faced among these 3 patients during the first cycle, 3 more patients will be included in the same dose level.</li><li>▪ If a DLT is no longer faced among these 6 patients during the first cycle, the recruitment will continue at the next dose level.</li><li>▪ If more than a DLT is faced among these 6 patients during the first cycle, the following patients will be included at a lower dose level (-1), until a total of 6 evaluable patients are treated with the MTD.</li></ul> <p>If DLTs appear in 2 or more patients at any dose level, it will be assumed that the MTD is exceeded and no more patients will be recruited at this dose level; patients already included at this dose level will not be treated with additional doses of study treatment.</p>	Dose level	Proposed dose	Change from previous dose	No of patients	-1*	Ruxolitinib 5 mg BID	-50%		1	<b>Ruxolitinib 10 mg BID</b>	<b>Starting dose</b>	<b>3</b>	2	Ruxolitinib 15 BID	+50%	3	3	Ruxolitinib 20 mg BID	+33%	3
Dose level	Proposed dose	Change from previous dose	No of patients																		
-1*	Ruxolitinib 5 mg BID	-50%																			
1	<b>Ruxolitinib 10 mg BID</b>	<b>Starting dose</b>	<b>3</b>																		
2	Ruxolitinib 15 BID	+50%	3																		
3	Ruxolitinib 20 mg BID	+33%	3																		

	If two or more DLTs appear in the lowest dose level (-1), the study treatment will end.
<b>Treatment Periods and Duration</b>	<p>The study will consist of two treatment periods in both arms, and the treatment duration period, although planned for 1 year, will be determined by the response of the patient to the study treatment.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. <u>First Treatment Period</u> consisting of the first 6 cycles.</li> <li>2. <u>Treatment Extension Period</u> consisting of additional cycles to the end of the planned treatment period of 1 year (12 cycles). To enter the Treatment Extension Period, the patient must meet both of the following criteria continuation on cycle 7 day 1. Otherwise, patient will discontinue treatment at the end of the First Treatment Period. <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ patient is benefiting from treatment in the opinion of the investigator and</li> <li>▪ <b>NO</b> evidence of disease progression defined as a spleen length increase of &gt;40% from baseline as measured by palpation.</li> </ul> </li> </ol> <p>Patients entering the Treatment Extension Period, who in opinion of the investigator, are continuing to benefit from treatment beyond 12 cycles of treatment, will be allowed to continue on study treatment for 2 years or until disease progression or unacceptable toxicity.</p>
<b>Number of Patients Planned</b>	The approximate sample size in this study may reach up to 44 evaluable patients, assuming a maximum of 6 evaluable patients treated at each dose (3 dose levels in each of the two arms) and the 10 additional patients per arm for the expansion phase.
<b>Criteria for Inclusion</b>	<p>Patients are included in the study if all of the following criteria are met:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Patients must be 18 years or older.</li> <li>2. Patients must be diagnosed with primary myelofibrosis (PMF), post-polycythemia vera myelofibrosis (PPV-MF) or post-essential thrombocythemia-myelofibrosis (PET-MF) irrespective of <i>JAK2</i> mutation status, guided by the criteria outlined in the 2008 World Health Organization (WHO) criteria for PMF<sup>9</sup> and the proposed criteria for PPV-MF and PET-MF outlined by the International Working Group for Myelofibrosis Research and Treatment (IWG-MRT)<sup>10</sup>.</li> <li>3. Patient must be classified as at least intermediate risk level 1 (1 or more prognostic factors) with at least one criteria other than age. The prognostic factors, defined by the International Working Group are<sup>11</sup>: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Age &gt; 65 years.</li> <li>▪ Presence of constitutional symptoms (weight loss &gt; 10% in the year preceding the screening visit, unexplained fever, or excessive night sweats persisting for more than 1 month).</li> <li>▪ Marked anemia (hemoglobin &lt; 10g/dL)*.</li> <li>▪ Leukocytosis (history of white blood cell count &gt; 25 x10<sup>9</sup>/L).</li> <li>▪ Circulating blasts ≥ 1%.</li> </ul> <p><i>*A hemoglobin value &lt; 10 g/dL must be demonstrated during the screening for patients who are not transfusion dependent. Patients receiving regular transfusions of packed red blood cells will be considered to have hemoglobin &lt; 10 g/dL for the purpose of evaluation of risk factors.</i></p> </li> <li>4. Patient must have palpable spleen of at least 5 cm from the costal margin to the point of greatest splenic protrusion at screening.</li> <li>5. Patients must have active symptoms of MF as measured by the Myeloproliferative Neoplasm Symptom Assessment Form Total Symptom Score (MPN-SAF TSS). Demonstrated as a minimum of 5 points in at least one item (scale 0-10), or two items of at least 3 points (scale 0-10).</li> <li>6. Patients naïve to JAK inhibitors treatment are eligible for treatment arm A. Patients non-responding to or relapsed after JAK inhibitors treatment must meet one of the following criteria at screening to be eligible for treatment arm B (patients with prior ruxolitinib [INC424] treatment must meet one of the criteria below after at least 12 weeks on ruxolitinib treatment): <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Patients with no improvement in spleen length and may or may not have a corresponding symptomatic improvement.</li> <li>▪ Patients with less than a 25% spleen length reduction by palpation and may or may not have a corresponding symptomatic improvement.</li> </ul> </li> </ol>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Patients that have had a 25% to 49% reduction in spleen length by palpation and without symptomatic improvement.</li> <li>▪ Patients who have lost benefit from prior treatment with a JAK inhibitor as per investigator (i.e. increased spleen length from nadir &gt;40% as measured by palpation and/or return of symptoms as per investigator's assessment).</li> </ul> <ol style="list-style-type: none"> <li>7. Platelet counts <math>\geq 50 \times 10^9/L</math> not reached with the aid of transfusions at screening or cycle 1 day 1.</li> <li>8. Patients with absolute neutrophil count <math>&gt; 1 \times 10^9/L</math> at screening without the use of granulocyte colony-stimulating factors.</li> <li>9. Fasting plasma glucose <math>\leq 120</math> mg/dL or <math>&lt; 6.7</math> mmol/L at screening.</li> <li>10. Serum creatinine <math>\leq 2 \times</math> upper limit of normal (ULN) at screening.</li> <li>11. Patients with peripheral blood blast count of <math>&lt;5\%</math> at screening.</li> <li>12. Patients with an ECOG performance status of 0, 1, or 2 at screening.</li> <li>13. Patients must have discontinued all drugs used to treat underlying MF disease no later than 7 days prior to screening evaluation visit.</li> </ol>
<b>Criteria Exclusion</b>	<b>for</b>	<p>Patients are excluded for participating in this study if 1 or more of the following criteria are met:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Pregnant or nursing (lactating) women, where pregnancy is defined as the state of a female after conception and until the termination of gestation, confirmed by a positive human chorionic gonadotropin (hCG) laboratory test.</li> <li>2. Women of child-bearing potential, defined as all women physiologically capable of becoming pregnant, unless they are using highly effective methods of contraception during dosing and for 4 weeks after the final dose of study medication. Highly effective contraception methods include: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Total abstinence (when this is in line with the preferred and usual lifestyle of the subject). Periodic abstinence (e.g. calendar, ovulation, symptothermal, post-ovulation methods) and withdrawal are not acceptable methods of contraception.</li> <li>▪ Female sterilization (have had surgical bilateral oophorectomy with or without hysterectomy) or tubal ligation at least six weeks before taking study treatment. In case of oophorectomy alone, only when the reproductive status of the woman has been confirmed by follow up hormone level assessment.</li> <li>▪ Male sterilization (at least 6 months prior to screening). For female subjects on the study the vasectomized male partner should be the sole partner for that subject.</li> <li>▪ Combination of any two of the following (a+b or a+c, or b+c): <ol style="list-style-type: none"> <li>a. Use of oral, injected or implanted hormonal methods of contraception or other forms of hormonal contraception that have comparable efficacy (failure rate <math>&lt;1\%</math>), for example hormone vaginal ring or transdermal hormone contraception.</li> <li>b. Placement of an intrauterine device or intrauterine system.</li> <li>c. Barrier methods of contraception: condom or occlusive cap (diaphragm or cervical/vault caps) with spermicidal foam/gel/film/cream/vaginal suppository.</li> </ol> </li> </ul> <p><i>In case of use of oral contraception women should have been stable on the same pill for a minimum of 3 months before taking study treatment.</i></p> <p>Women are considered post-menopausal and not of child bearing potential if they have had 12 months of natural (spontaneous) amenorrhea with an appropriate clinical profile (e.g. age appropriate, history of vasomotor symptoms) or six months of spontaneous amenorrhea with serum follicle-stimulating hormone (FSH) levels <math>&gt; 40</math> mIU/mL and estradiol <math>&lt; 20</math> pg/mL or have had surgical bilateral oophorectomy (with or without hysterectomy) at least six weeks ago. In the case of oophorectomy alone, only when the reproductive status of the woman has been confirmed by follow up hormone level assessment is she considered not of child bearing potential.</p> <li>3. Previous treatment with the following JAK inhibitors (including ruxolitinib [INC424]) that resulted in clinically significant toxicities at the discretion of the investigator.</li> <li>4. Patient with clinically significant bacterial, fungal, parasitic or viral infection</li> </li></ol>

	<p>which require therapy at screening. Patients with acute bacterial infections requiring antibiotic use should delay screening/enrollment until the course of antibiotic therapy has been completed.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>5. Patients with known active hepatitis B or C or with known HIV positivity (testing is not mandatory).</li> <li>6. Patients with impairment of gastrointestinal function or gastrointestinal disease that may significantly alter the absorption of ruxolitinib, nilotinib and prednisone at screening (e.g. uncontrolled nausea, vomiting, diarrhea, mal-absorption syndrome, small bowel resection).</li> <li>7. Patient with a concurrent malignancy or malignancy within 3 years of screening, with the exception of adequately treated basal or squamous cell carcinoma, non-melanomatous skin cancer or curatively resected cervical cancer.</li> <li>8. Patient who has not recovered to grade 1 or better from any AEs (except alopecia, fatigue, nausea, vomiting) related to previous antineoplastic therapy before screening procedures are initiated.</li> <li>9. Patients receiving the following treatments/medications: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ An enzyme-inducing anti-epileptic drug within 2 weeks prior to starting study treatment.</li> <li>▪ Medication that has a known risk to prolong the QT interval or induce <i>Torsades de Pointes</i>, and the treatment cannot be discontinued or switched to a different medication prior to starting study treatment.</li> <li>▪ Treatment with a potent systemic inhibitor or a potent systemic inducer of CYP3A4 at the time of screening and cannot be discontinued or switched to alternative medication prior to starting study treatment.</li> <li>▪ Any regular use of drugs that interferes with coagulation or inhibits platelet function. NOTE: low doses of aspirin <math>\leq 150</math> mg/day and low molecular weight heparin are allowed.</li> </ul> </li> <li>10. Patients who have had splenic irradiation within 12 months prior to screening.</li> <li>11. Patient has undergone the following invasive procedures: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Major surgical procedure, open biopsy or significant traumatic injury &lt; 14 days prior to starting study drug or has not recovered from side effects of such therapy.</li> </ul> </li> <li>12. Patient has a history of cardiac dysfunction including any of the following: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Myocardial infarction within the past 6 months documented by elevated cardiac enzymes or persistent regional wall abnormalities on assessment of left ventricular ejection fraction (LVEF) function.</li> <li>▪ History of documented congestive heart failure (New York Heart Association functional classification III-IV).</li> <li>▪ Documented cardiomyopathy.</li> </ul> </li> <li>13. Patient has active cardiac disease including any of the following: <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ LVEF &lt; 50% as determined by multiple gated acquisition (MUGA) or echocardiogram (ECHO).</li> <li>▪ QTc &gt; 480 msec on screening electrocardiogram (ECG) (QTcF, using the Fridericia formula).</li> <li>▪ Angina pectoris that requires the use of anti-anginal medication.</li> <li>▪ Ventricular arrhythmias except for benign premature ventricular contractions.</li> <li>▪ Supraventricular and nodal arrhythmias requiring a pacemaker or not controlled with medication.</li> <li>▪ Conduction abnormality requiring a pacemaker.</li> <li>▪ Valvular disease with documented compromise in cardiac function.</li> <li>▪ Symptomatic pericarditis.</li> </ul> </li> <li>14. Concurrent uncontrolled clinical disease and/or severe that, in the opinion of the investigator, could cause unacceptable safety risks or compromise compliance with the protocol (e.g. ischemic heart disease, atherothrombotic events, peripheral arterial occlusive disease, cerebrovascular accident (CVA) / stenosis symptomatic carotid) or uncontrolled diabetes.</li> <li>15. Patients with inadequate liver or renal function at screening as demonstrated by (not related with MF): <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Encephalopathy grade 1 or more, as per West Haven Criteria.</li> </ul> </li> </ol>
--	---

	<ul style="list-style-type: none"> <li>Total bilirubin <math>\geq 3 \times \text{ULN}</math> and subsequent determination of direct bilirubin <math>\geq 2 \times \text{ULN}</math>.</li> <li>Alanine aminotransferase (ALT) or aspartate aminotransferase (AST) <math>&gt; 3 \times \text{ULN}</math>.</li> <li>MDRD-estimated glomerular filtration rate (eGFR) <math>&lt; 30 \text{ mL/min/1.73m}^2</math> or on dialysis.</li> </ul> <p>16. Patients who currently are willing candidates for a stem cell transplantation at the time of the screening assessments.</p> <p>17. Patients under ongoing treatment with another investigational medication or having been treated with an investigational medication within 7 days.</p> <p>18. Patients who are unable to comprehend or are unwilling to sign an informed consent form.</p> <p>19. Patients with active alcohol or drug addiction that, in the investigator's expert judgment, would interfere with their ability to comply with the study requirements.</p> <p>20. Patients with any concurrent condition that, in the investigator's opinion, would jeopardize the safety of the patient or compliance with the protocol.</p>																		
<b>Primary Measure and Endpoint</b>	<p>The primary measure is the occurrence of DLTs.</p> <p>A DLT is defined as an AE or abnormal laboratory value assessed as unrelated to disease, disease progression, inter-current illness, or concomitant medications that occurs within the first 28 days (cycle 1 day 1 to cycle 1 day 28) of treatment with ruxolitinib, nilotinib and prednisone and meets any of the following criteria.</p> <p><b>Table. Criteria for defining dose-limiting toxicity</b></p> <table> <tr> <th>Toxicity</th><th>DLT criteria</th></tr> <tr> <td colspan="2"><b>Hematologic</b></td></tr> <tr> <td>Blood and lymphatic system disorders</td><td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Neutropenia CTCAE grade 4*.</li> <li>Febrile neutropenia CTCAE grade <math>\geq 3</math> (absolute neutrophil count <math>&lt; 1.0 \times 10^9/\text{L}</math> + Fever <math>\geq 38.5^\circ\text{C}</math>).</li> <li>Thrombocytopenia CTCAE grade 4 (platelets <math>&lt; 25 \times 10^9/\text{L}</math>)*.</li> <li>Hemorrhagic event CTCAE grade <math>\geq 2</math>.</li> <li>Anemia CTCAE grade 4 for <math>\geq 7</math> days despite packed red blood cell transfusions.</li> </ul> </td></tr> <tr> <td colspan="2"><b>Non-hematologic</b></td></tr> <tr> <td>Skin and subcutaneous tissue disorders: Rash and/or photosensitivity</td><td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Rash CTCAE Grade <math>\geq 3</math> for <math>&gt; 7</math> consecutive days despite skin toxicity treatment.</li> <li>Rash CTCAE grade 4.</li> </ul> </td></tr> <tr> <td>Metabolism and nutrition disorders: Hyperglycemia</td><td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Hyperglycemia grade 3 (fasting plasma glucose <math>&gt; 250 - 400\text{mg/dL}</math>) for <math>&gt; 7</math> consecutive days despite anti-diabetic treatment.</li> <li>Hyperglycemia grade 4 (fasting plasma glucose <math>&gt; 400\text{mg/dL}</math>) confirmed with a repeat fasting plasma glucose within 24 hours.</li> <li>Hyperglycemia leading to diabetic keto-acidosis, hospitalization for intravenous insulin infusion, or non-ketotic coma.</li> </ul> </td></tr> <tr> <td>Gastrointestinal disorders</td><td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Diarrhea CTCAE grade <math>\geq 3 \geq 48</math> hours, despite the use of anti-diarrhea therapy.</li> <li>Nausea/vomiting CTCAE grade <math>\geq 3 \geq 48</math> hours, despite the use of anti-emetic therapy.</li> </ul> </td></tr> <tr> <td>Investigations</td><td> <ul style="list-style-type: none"> <li>Total bilirubin CTCAE grade <math>\geq 4</math>, coincident direct bilirubin <math>\geq 0.5 \text{ mg/dL}</math>.</li> <li>AST or ALT CTCAE grade <math>\geq 4</math> for <math>&gt; 7</math> consecutive days.</li> <li>AST or ALT CTCAE grade 4.</li> </ul> </td></tr> <tr> <td>Cardiac</td><td> <ul style="list-style-type: none"> <li>QTc prolongation <math>&gt; \text{CTCAE grade 3}</math> confirmed by triplicate ECG 5 minutes apart in the absence of other drugs that are known to cause QT prolongation, that persist following the correction of electrolyte abnormalities, if any.</li> </ul> </td></tr> </table>	Toxicity	DLT criteria	<b>Hematologic</b>		Blood and lymphatic system disorders	<ul style="list-style-type: none"> <li>Neutropenia CTCAE grade 4*.</li> <li>Febrile neutropenia CTCAE grade <math>\geq 3</math> (absolute neutrophil count <math>&lt; 1.0 \times 10^9/\text{L}</math> + Fever <math>\geq 38.5^\circ\text{C}</math>).</li> <li>Thrombocytopenia CTCAE grade 4 (platelets <math>&lt; 25 \times 10^9/\text{L}</math>)*.</li> <li>Hemorrhagic event CTCAE grade <math>\geq 2</math>.</li> <li>Anemia CTCAE grade 4 for <math>\geq 7</math> days despite packed red blood cell transfusions.</li> </ul>	<b>Non-hematologic</b>		Skin and subcutaneous tissue disorders: Rash and/or photosensitivity	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rash CTCAE Grade <math>\geq 3</math> for <math>&gt; 7</math> consecutive days despite skin toxicity treatment.</li> <li>Rash CTCAE grade 4.</li> </ul>	Metabolism and nutrition disorders: Hyperglycemia	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hyperglycemia grade 3 (fasting plasma glucose <math>&gt; 250 - 400\text{mg/dL}</math>) for <math>&gt; 7</math> consecutive days despite anti-diabetic treatment.</li> <li>Hyperglycemia grade 4 (fasting plasma glucose <math>&gt; 400\text{mg/dL}</math>) confirmed with a repeat fasting plasma glucose within 24 hours.</li> <li>Hyperglycemia leading to diabetic keto-acidosis, hospitalization for intravenous insulin infusion, or non-ketotic coma.</li> </ul>	Gastrointestinal disorders	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diarrhea CTCAE grade <math>\geq 3 \geq 48</math> hours, despite the use of anti-diarrhea therapy.</li> <li>Nausea/vomiting CTCAE grade <math>\geq 3 \geq 48</math> hours, despite the use of anti-emetic therapy.</li> </ul>	Investigations	<ul style="list-style-type: none"> <li>Total bilirubin CTCAE grade <math>\geq 4</math>, coincident direct bilirubin <math>\geq 0.5 \text{ mg/dL}</math>.</li> <li>AST or ALT CTCAE grade <math>\geq 4</math> for <math>&gt; 7</math> consecutive days.</li> <li>AST or ALT CTCAE grade 4.</li> </ul>	Cardiac	<ul style="list-style-type: none"> <li>QTc prolongation <math>&gt; \text{CTCAE grade 3}</math> confirmed by triplicate ECG 5 minutes apart in the absence of other drugs that are known to cause QT prolongation, that persist following the correction of electrolyte abnormalities, if any.</li> </ul>
Toxicity	DLT criteria																		
<b>Hematologic</b>																			
Blood and lymphatic system disorders	<ul style="list-style-type: none"> <li>Neutropenia CTCAE grade 4*.</li> <li>Febrile neutropenia CTCAE grade <math>\geq 3</math> (absolute neutrophil count <math>&lt; 1.0 \times 10^9/\text{L}</math> + Fever <math>\geq 38.5^\circ\text{C}</math>).</li> <li>Thrombocytopenia CTCAE grade 4 (platelets <math>&lt; 25 \times 10^9/\text{L}</math>)*.</li> <li>Hemorrhagic event CTCAE grade <math>\geq 2</math>.</li> <li>Anemia CTCAE grade 4 for <math>\geq 7</math> days despite packed red blood cell transfusions.</li> </ul>																		
<b>Non-hematologic</b>																			
Skin and subcutaneous tissue disorders: Rash and/or photosensitivity	<ul style="list-style-type: none"> <li>Rash CTCAE Grade <math>\geq 3</math> for <math>&gt; 7</math> consecutive days despite skin toxicity treatment.</li> <li>Rash CTCAE grade 4.</li> </ul>																		
Metabolism and nutrition disorders: Hyperglycemia	<ul style="list-style-type: none"> <li>Hyperglycemia grade 3 (fasting plasma glucose <math>&gt; 250 - 400\text{mg/dL}</math>) for <math>&gt; 7</math> consecutive days despite anti-diabetic treatment.</li> <li>Hyperglycemia grade 4 (fasting plasma glucose <math>&gt; 400\text{mg/dL}</math>) confirmed with a repeat fasting plasma glucose within 24 hours.</li> <li>Hyperglycemia leading to diabetic keto-acidosis, hospitalization for intravenous insulin infusion, or non-ketotic coma.</li> </ul>																		
Gastrointestinal disorders	<ul style="list-style-type: none"> <li>Diarrhea CTCAE grade <math>\geq 3 \geq 48</math> hours, despite the use of anti-diarrhea therapy.</li> <li>Nausea/vomiting CTCAE grade <math>\geq 3 \geq 48</math> hours, despite the use of anti-emetic therapy.</li> </ul>																		
Investigations	<ul style="list-style-type: none"> <li>Total bilirubin CTCAE grade <math>\geq 4</math>, coincident direct bilirubin <math>\geq 0.5 \text{ mg/dL}</math>.</li> <li>AST or ALT CTCAE grade <math>\geq 4</math> for <math>&gt; 7</math> consecutive days.</li> <li>AST or ALT CTCAE grade 4.</li> </ul>																		
Cardiac	<ul style="list-style-type: none"> <li>QTc prolongation <math>&gt; \text{CTCAE grade 3}</math> confirmed by triplicate ECG 5 minutes apart in the absence of other drugs that are known to cause QT prolongation, that persist following the correction of electrolyte abnormalities, if any.</li> </ul>																		

	Mood disorders	<ul style="list-style-type: none"> <li>CTCAE grade 2 mood alteration that does not resolve to &lt; grade 1 within 14 days despite medical treatment (for anxiety only, if worsened from baseline).</li> <li>≥ CTCAE grade 3 mood alteration.</li> </ul>
	Others	<ul style="list-style-type: none"> <li>Any CTCAE grade ≥ 3 non-hematologic toxicity for ≥ 7 days.</li> <li>Any CTCAE grade 4 non-hematologic toxicity.</li> </ul>
	<p>*In two consecutive assessments, the second being considered valid and final.</p> <p>For toxicities requires a time-window in order to be defined as DLTs (grade 3 non-hematologic toxicity for ≥ 7 consecutive days), a subsequent visit and/or laboratory assessments must be scheduled accordingly. i.e., if a grade 3 non-hematologic toxicity is observed, it must also be observed at least 7 days later, with no intervening lower grades.</p>	
<b>Secondary Measures and Endpoints</b>	<p>The <b>secondary efficacy measures</b> are as follows:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>The percentage of patients with at least 50% reduction in palpable spleen length at 24 and 48 weeks.</li> <li>The percentage of patients who have a ≥ 50% reduction from baseline to 12, 24 and 48 weeks in the MPN-SAF TSS.</li> </ul>	
<b>Safety Measures and Endpoints</b>	<p>Safety data will be collected by monitoring the frequency, duration and severity of AEs graded by the National Cancer Institute CTCAE version 4.0, performing physical examinations, and evaluating changes in vital signs, ECOG performance status, laboratory values and ECGs throughout the study.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>All grade AEs, grade 3 and 4 AEs, and serious adverse events (SAEs).</li> <li>Physical examination.</li> <li>Change in vital signs and ECOG performance status.</li> <li>Laboratory values (serum chemistry and hematology).</li> <li>Cardiac function as assessed by ECGs.</li> </ul>	
<b>Statistical Considerations</b>	<p>No formal statistical power calculations to determine sample size will be performed for this study.</p> <p>The approximate sample size in this study may reach up to 44 evaluable patients, assuming a maximum of 6 evaluable patients treated at each dose (3 dose levels in each of the two arms) and the 10 additional patients per arm for the expansion phase.</p> <p>The exact number of patients required for this study will depend on the number of dose levels finally tested in the dose escalation phase to determine the MTD. In addition, the potential for dropout allows for expanding a cohort with new additional patients until reaching the required number of evaluable patients.</p>	
<b>Study time lines</b>	<p>The first patient first visit (FPFV) will occur on June 2017 and the recruitment period is planned to last 2 years. The data cutoff date will be the date of the last patient last visit (LPLV).</p>	











